

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
in Marburg a.d. Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. H. Hamelmann

FUNKTIONSPARAMETER DER ISOLIERT
PERFUNDIERTEN RATTENLEBER IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER KONSERVIERUNGSDAUER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

UTE WILLIGERODT-PRIES, geb. Willigerodt
—
aus Goslar

Marburg 1977
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik
in Marburg a. d. Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. H. Hamelmann

FUNKTIONSPARAMETER DER ISOLIERT
PERFUNDIERTEN RATTENLEBER IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER KONSERVIERUNGSDAUER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

UTE WILLIGERODT-PRIES, geb. Willigerodt
aus Goslar

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 16. 12. 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof.Dr.med.F.Neurath

Referent: Prof.Dr.med.H.Hamelmann

Correferent: Prof.Dr.med.dent.H.Bernhardt

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

I. Vorwort	1
II. Einleitung	2
III. Die Entwicklung der deutschen Literatur im 19. Jahrhundert	3
IV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	4
V. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	5
VI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	6
VII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	7
VIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	8
IX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	9
X. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	10
XI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	11
XII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	12
XIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	13
XIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	14
XV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	15
XVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	16
XVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	17
XVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	18
XIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	19
XX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	20
XXI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	21
XXII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	22
XXIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	23
XXIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	24
XXV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	25
XXVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	26
XXVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	27
XXVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	28
XXIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	29
XXX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	30
XXXI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	31
XXXII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	32
XXXIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	33
XXXIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	34
XXXV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	35
XXXVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	36
XXXVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	37
XXXVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	38
XXXIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	39
XL. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	40
XLI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	41
XLII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	42
XLIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	43
XLIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	44
XLV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	45
XLVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	46
XLVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	47
XLVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	48
XLIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	49
L. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	50
LI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	51
LII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	52
LIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	53
LIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	54
LV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	55
LVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	56
LVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	57
LVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	58
LIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	59
LX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	60
LXI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	61
LXII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	62
LXIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	63
LXIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	64
LXV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	65
LXVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	66
LXVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	67
LXVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	68
LXIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	69
LXX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	70
LXXI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	71
LXXII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	72
LXXIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	73
LXXIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	74
LXXV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	75
LXXVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	76
LXXVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	77
LXXVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	78
LXXIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	79
LXXX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	80
LXXXI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	81
LXXXII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	82
LXXXIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	83
LXXXIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	84
LXXXV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	85
LXXXVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	86
LXXXVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	87
LXXXVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	88
LXXXIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	89
LXXXX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	90
LXXXXI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	91
LXXXXII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	92
LXXXXIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	93
LXXXXIV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	94
LXXXXV. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	95
LXXXXVI. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	96
LXXXXVII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	97
LXXXXVIII. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	98
LXXXXIX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	99
LXXXXX. Die deutsche Literatur im 19. Jahrhundert	100

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Problematik und Fragestellung zu den vorliegenden experimentellen Untersuchungen	6
III. Material und Methodik	14
3.1. Perfusionsanlage	14
3.2. Tiermaterial	15
3.3. Narkose und Operationstechnik	15
3.4. "wash out" und Perfusionsmedium	17
3.5. Versuchsdurchführung	18
3.6. Gruppen	20
3.7. Standardbelastungen zur Erfassung der Leberfunktionen	21
3.8. zusätzliche Einzeluntersuchungen	21
3.9. Sonstiges	21
3.10. Biochemische Untersuchungen	22
3.10.1. Glukose	22
3.10.2. Laktat	23
3.10.3. Harnstoff	24
3.10.4. β -Hydroxybutyrat (β -HOB)	25
3.10.5. Acetacetat (AC-AC)	27
3.11. Statistische Berechnungen	29
3.11.1. Mittelwert und Standardabweichung	29
3.11.2. Duncan-Test für abhängige Daten	29
3.11.3. t-Test nach STUDENT	30
IV. Vorversuche	31
V. Ergebnisse	32
5.1. Glukose	32
5.2. Laktat	38
5.3. Harnstoff	43
5.4. Ketonkörper	47
VI. Diskussion	58
VII. Zusammenfassung	66
VIII. Tabellen	68
IX. Literaturverzeichnis	I

I. Einleitung

Durch die ersten orthotopen Lebertransplantationen am Menschen, die von Starzl (88) und Calne (12) durchgeführt wurden, ist für Patienten mit beginnender Leberinsuffizienz nach erfolgloser konservativer Therapie - eventuell mit Austauschtransfusion und extrakorporaler Leberassistenz - die operationstechnische Grundlage zu einer weiteren Therapiemöglichkeit geschaffen (93). Zur Hauptindikation eines operativen Organersatzes zählen angeborene Gallengangsatresien (93, 90, 7, 10, 62, 89), die Lebercirrhose nur, sofern es sich um eine postnekrotische Alkohol - oder biliäre Cirrhose handelt (93); weiterhin kann er indiziert sein im Falle des akuten Leberversagens bei fulminanter Hepatitis und akuter gelber Leberdystrophie sowie inoperablen Gallengangsverletzungen (93). Ebenso haben Starzl et al. (91) günstige Transplantationsresultate bei Kindern mit angeborenen Stoffwechselstörungen (wie z.B. Morbus Wilson) erzielen können.

Während man früher das maligne Hepatom sowie Gallengangscarcinome (93, 90, 10) zum Indikationsbereich der Lebertransplantation hinzurechnete, stellen diese Krankheitsbilder heute eher eine Kontraindikation dar; denn auch im späteren postoperativen Verlauf kam es häufig zu einer Fernmetastasierung des Tumors, die nach derzeit gültiger Ansicht im wesentlichen durch die gleichlaufende immunsuppressive Therapie bedingt war (93, 90).

Das Problem einer Lebertransplantation ist vom operationstechnischen Aspekt her heutzutage gelöst. Weitere Ansatzpunkte zu Untersuchungen bietet aber die Methode der Organkonservierung. Hier stehen sich mehrere Verfahren gegenüber, deren Ziel es jeweils ist, die Vitalität des Organs während der Dauer der Gesamtschämie und damit der Hypoxie zu erhalten.

Für die parenchymatösen Organe wie Herz, Niere und Leber gestaltet sich die Konservierung problematisch, da keine der bisher bekannten Konservierungsmethoden es ermöglicht, eine Organbank für diese Organe einzurichten, die für Haut, Cornea, Knochenmark schon des längeren erfolgreich besteht (28). Zur Überbrückung der hypoxischen Phase - zwischen Entnahme aus dem Spenderorganismus und erfolgter Revaskularisierung im Körper des Empfängers - gelangten verschiedene Konservierungsmethoden zur Anwendung wie die Schwerkraftperfusion, teilweise unter den Bedingungen einer Hypothermie oder gleichzeitiger hyperbarer Lagerung (80, 64, 85, 28, 15, 38).

Perfusionen isolierter Organe, die weitgehendst die Zwecke einer Durchblutung erfüllen und einen unveränderten Ablauf der Stoffwechselvorgänge gewährleisten, wären allen anderen Methoden der Lebendkonservierung vorzuziehen. Bei Perfusionen in Normothermie mit einem erythrocytfreien Medium reichte nach Beobachtungen von Hell et al. die Sauerstoffkapazität für das Gewebe des isolierten Organs nicht aus; dagegen traten nach mehr als 3-stündiger Perfusion mit einem erythrocythaltigem Perfusat Gewebsödeme, Gefäßspasmen und Kapillarembolien auf (28). Wurde in Hypothermie mit zellhaltigen Lösungen perfundiert, konnte der Sauerstoffbedarf zwar ausreichend gedeckt werden, kam es aber aufgrund der Viskosität des Blutes und bei langsamer Perfusion zu einer Sedimentierung der Erythrocyten, die ebenfalls eine Gefäßverstopfung in den abhängigen Gewebspartien und eine massive Ödematisierung zur Folge hatten (28). Durch gleichzeitige Anwendung von hyperbarem Sauerstoff und hypothermer Perfusion gelang es Brettschneider und Starzl (9) Hundelebern mit verdünntem Blut über 24 Stunden erfolgreich zu perfundieren.

Zur Erhaltung der Zellintegrität fanden auch sogen. zell- und membranstabilisierende Substanzen (Mg, Procain, Megaphen, Steroide) (80, 64, 85, 28, 15) Anwendung. Sie sollen eine Verlangsamung des Stoffwechselgeschehens durch reversible Hemmung von Zellfermenten bzw. eine Stabilisierung von zellulären und intrazellulären Membranpotentialen bewirken (28).

Durch die hyperbare Lagerung werden Diffusionsvorgänge erhöht. Sie verhindert dadurch weitgehendst eine Anoxie des unter Überdruck stehenden Gewebes, da die Diffusion von Sauerstoff in das Organ und CO_2 aus dem Gewebe des konservierten Organs heraus erhöht ist. Die maximale Gewebsdicke, die durch Diffusion allein versorgt werden kann, beträgt aber bei 3 ata (Atmosphären absolut) und 4°C nur ungefähr 5 mm (28).

Durch die alleinige Hypothermie, wie hypotherme Lagerung, soll bei dem zu konservierenden Organ eine Reduktion des Stoffwechsels auf ein Minimum erreicht werden, was zu einer Verlängerung der Ischämietoleranz des isolierten Organs führt. Versuche ergaben, daß der Sauerstoffverbrauch des Gewebes mit fallender Temperatur exponentiell abnimmt: bei 10°C beträgt der Sauerstoffbedarf weniger als 10 % des Bedarfs in Normothermie; metabolische Stoffwechselfunktionen dagegen nehmen linear ab (28).

Da gerade Sauerstoffmangel zu irreversiblen Organschädigungen führt, scheint die hypotherme Lagerung des Transplantats unmittelbar bei 4°C am geeignetsten. Gegen die völlige Einstellung der Stoffwechselfunktionen durch Tiefgefrieren der isolierten Organe sprechen der mechanische Zelltod durch Eiskristallbildung aus der Gewebslösung mit Erreichen des Gefrierpunktes sowie schwere osmotische Veränderungen (28).

Bisher erreichte Ischämietoleranzen:

Mieny erzielte sowohl an Schweinelebern (49) nach einer 24-stündigen Perfusion mit verdünntem oxygeniertem Blut als auch an Pavianlebern (50) nach einer 20-stündigen Konservierung durch eine einfache hypotherme Lagerung bei 5°C eine ausreichend gute Leberfunktion nach erfolgter Revaskularisierung. Lie (96), der ebenfalls Konservierungsversuche an Schweinelebern durch einfache Hypothermie (2-4°C) über eine Zeitspanne von 24 Stunden - allerdings ohne anschließende Transplantation - durchführte, wies aufgrund von elektronenmikroskopischer Untersuchungen bereits nach 12-stündiger, teilweise schon nach 6 - 8-stündiger Lagerung schwerwiegende Schädigungen der Ultrastrukturen in den Hepatozyten nach.

Gute Erfolge bei bis zu 18 Stunden konservierten Schweinelebern konnte Calne (11) mit seiner Methode erreichen. Er verwandte bei den zu transplantierenden Organen eine intermittierende (alle 5 Min.) hypotherme (3-5°C) Stoßperfusion von 20 ml unter einem Druck von 40-60 mm Hg. Die Tiere mit so vorbereiteten Transplantaten hatten eine Überlebenszeit bis zu 57 Tagen, während die mit länger konservierten Lebern (18-24 Stunden) 6-8 Stunden nach der Operation starben.

Die zur Transplantation notwendigen Maßnahmen - Gewinnung des Transplantats, Transport an den Ort des Empfängers sowie operative Vorbereitung des Empfängerorganismus und Implantation - erfordern eine 6 bis 12-stündige Konservierung der isolierten Leber; diese Konservierungsdauer wird eine Schädigung der Leberzellen erwarten lassen, die sich als Funktionseinschränkung äußern wird. Zwar werden Vitalität und Funktionsintegrität der übertragenen Leber endgültig erst nach abgeschlossener Implantation im Empfängerorganismus beurteilbar sein,

dennoch wäre es erstrebenswert, funktionelle Beeinträchtigungen der Leber während oder mittelbar im Anschluß an die Konservierungsphase aufzudecken, die als prognostischer Parameter der Organfunktion unmittelbar nach der Transplantation zu verwerten sind. Auf die kritische Problematik dieser Zielsetzung weisen auch Calne (12) und Lie (96) hin, daß der einzige Parameter für die Organvitalität nach erfolgter Transplantation die Wiederaufnahme der Funktion sei.

II. Problematik und Fragestellung zu den vorliegenden experimentellen Untersuchungen

In der hiesigen Klinik bestand um Struck eine Arbeitsgruppe, die sich seit mehreren Jahren mit der experimentellen Lebertransplantation beschäftigte. Hierzu liegen zahlreiche Veröffentlichungen (95, 94, 57, 45) zur Organkonservierung wie auch zur Lebertransplantation am Schwein vor. Während der Konservierungszeit der zu transplantierenden Leber sowie der Transplantation zeigten sich im Rahmen der biochemischen Parameter jedoch nicht in jedem Falle Daten, die eine eindeutige Korrelation zwischen den biochemischen und klinischen Befunden brachten.

Ebenso konnte Fischer (91) bei seinen am Schwein experimentell erzeugten Leberzerfallskomata anhand der Prüfung von klinisch-chemischen Parameter wie der cytoplasmatischen Enzyme LDH und GOT, der Cholestase erzeugenden Enzyme LAP und β -GT sowie der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase keine eindeutige Korrelation bezüglich der Prognose wie auch der Möglichkeit des Überlebens der Tiere sehen.

Die im bisherigen Ausmaß von uns durchgeführten Konservierungsversuche und Transplantationen am Schwein erforderten einen erheblichen finanziellen, personellen und zeitlichen Aufwand. Im Rahmen weiterer Untersuchungen zu einer optimalen Konservierung der Leber suchten wir daher nach einem Modell, das uns bei wesentlich geringerem Aufwand ermöglichen sollte, aussagefähige Kriterien über die Vitalität der konservierten Leber zu erarbeiten. Hierzu bot sich die isolierte Rattenleberperfusion im rezirkulierenden System nach Miller (53) und Schimassek (67) an. Bei unseren Versuchen sollte es darauf ankommen, weitere intrazelluläre leberspezifische Funktionsleistungen auf ihre Bedeutung als Parameter für die Funktionsintegrität des gesamten Organs, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konservierungszeiten (0, 2, 4, 8 Std.) zu überprüfen.

Hierzu schienen uns geeignet:

1. die Kohlenhydratstoffwechselvorgänge wie Gluconeogenese und Glykolyse, die vorwiegend im Cytoplasma der Leberzellen lokalisiert sind;
2. die Harnstoffsynthese und Ketonkörperproduktion, die sich in den feineren Kompartimenten, in den Mitochondrien, vollziehen.

zu 1. a) Glukose

Eine wichtige Rolle der Leber im Stoffwechsel des Organismus besteht in der Aufrechterhaltung und Regulierung des Blutzuckerspiegels. Bei absinkender Tendenz des Blutzuckergehaltes kommt es zur Mobilisation der Glykogenreserven und aufgrund der Glycogenolyse zu einer vermehrten Glukoseausschüttung ins Blut. Bei Verminderung der Glykogenvorräte z.B. nach längerer Nahrungskarenz oder starkem Kohlenhydratmangel setzt bei der gesunden Leber die Glukoneogenese aus Laktat oder glukoplastischen Aminosäuren ein, um auf diese Weise einen konstanten Blutzuckergehalt zu gewährleisten.

Unter der Milchsäure-Infusionsbelastung sollte das Verhalten der Glukose einen Parameter für unsere Untersuchungen darstellen.

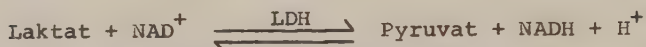
zu 1. b) Laktat und Pyruvat

Infolge Sauerstoffmangels, bedingt durch erhöhte Muskeltätigkeit des Organismus oder eine hypoxische Phase, steigt der Laktatgehalt des Blutes aufgrund verstärkter Glykolyse an.

Bei Sauerstoffzutritt dagegen würde das Pyruvat oxydativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert, größtenteils in den Zitronensäurezyklus eingehen und zur Bildung von Oxalacetat beitragen.

Die anfallende Milchsäure wird der Leber auf dem Blutwege zugeführt und teilweise von ihr zu Glykogen bzw. Glukose über den CORI-Cyclus resynthetisiert (35).

Um eine Aussage über den Funktionszustand der isoliert perfundierten Leber machen zu können, bedarf es neben dem Laktatgehalt auch der Pyruvatwerte im Medium bzw. des Quotienten beider Substrate, da sie in einem dynamischen Gleichgewicht miteinander stehen.



Aufgrund von Untersuchungen von Schimassek (68) und Hohorst (35) gibt der Quotient aus Laktat und Pyruvat Aufschluß über den Reduktionszustand des extramitochondrialen NAD/NADH-Systems. Zur Erreichung des optimalen Quotienten von 10 bedarf es in der Leberzelle eines intakten Stoffwechsels und einer Regulation über die Zellmembran hinweg (68). Folglich kann der L/P-Quotient als ein geeigneter und schnell reagierender Indikator für die Beurteilung der Alteration von Lebergewebe angesehen werden (35).

Wie die Arbeit von Miertsch (52) zeigte, bewiesen Perfusionsversuche mit einem Medium (Krebs-Henseleit-Puffer, Tab. 1), das keine glukoplastischen Substanzen enthielt, daß die isolierte Rattenleber ohne präoperative Nahrungskarenz durchaus in der Lage ist, den Glukosespiegel im Medium nach einer Zeitspanne von 45 Versuchsminuten auf ein konstantes Niveau einzuregulieren. In Tabelle 1 ist der Albumin-Tyrode-Lösung, die in unseren Versuchen als Perfusionsmedium Verwendung fand, der Krebs-Henseleit-Puffer, der anderen Arbeitsgruppen in ähnlichen Versuchsserien als Perfusionslösung diente, gegenübergestellt.

Tab. 1: Gegenüberstellung der Perfusionsmedien (je 100 ml)

a) Albumin-Tyrode-Lsg.		b) Krebs-Henseleit-Puffer (52)	
NaCl	0,8 g	NaCl	0,8 g
KCl	44 mg	KCl	41 mg
CaCl ₂ .2 H ₂ O	44,5 mg	CaCl ₂	43,3 mg
MgCl ₂ .6 H ₂ O	10 mg	KH ₂ PO ₄	18,8 mg
NaHCO ₃	100 mg	MgCl ₂	34,0 mg
D-Glukose.H ₂ O	88 mg	NaHCO ₃	249 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	17 mg	Glukose	5 ml (0,3 M/l)
Na-D,L-Laktat	20 mg		
Na-Pyruvat	1 mg	Rinderalbumin	5 g
		Bromthalein	50 µl
Rinderalbumin	3,1 g	FC - 75	3 ml
Erythrocyten	100 g Hb/l		

In der vorgenannten Zusammensetzung unterscheiden sich die beiden Perfusionslösungen im wesentlichen:

1. Beide Lösungen weisen Glukose im Ausgangsmedium auf, der Krebs-Henseleit-Puffer enthält jedoch keinerlei glukoplastischen Stoffe wie Pyruvat, Laktat etc.
2. Der Bicarbonat-Gehalt ist in der Albumin-Tyrode-Lösung wesentlich geringer, was leicht zu einem instabilen pH-Wert während der Perfusionen führen kann (69).
3. Der Krebs-Henseleit-Puffer enthält in der vorgenannten Zusammensetzung anstatt der Erythrocytensuspension FC-75, eine inerte Flüssigkeit der Familie der organischen Fluorchemikalien, als Sauerstoffträger (52), während andere Arbeitsgruppen (29) auch gewaschene Humanerythrocyten als Sauerstoffträger verwandten. Zweifellos schaltet die hämoglobinfreie Perfusion eine eventuelle Eigenstoffwechseltätigkeit der Erythrocyten

aus, auf der anderen Seite scheinen nach Untersuchungen von Kessler und Schubotz (38) durch die fehlende O_2 -Pufferwirkung des Hämoglobins große Sauerstoffmengen ungenutzt das Perfusionssystem zu passieren.

Weitere Untersuchungen von Schimassek (68), Graf (25) und Stähler (86) ergaben, daß bei Perfusionen der isolierten Leber im rezirkulierenden System mit Albumin-Tyrode-Lösung auch ohne Laktat-Infusion es allein durch den anfänglichen Laktat- und Pyruvat-Mediumsgehalt zu einem Anstieg der Glukose-Konzentration im Medium kam. Schmidt (75) konnte im Gesamtversuch jedoch nur eine Zunahme von ca. 10% ermitteln. Schimassek dagegen beobachtete lediglich eine Tendenz zur Einregulierung des Blutzuckerspiegels (68). Krebs (29) konnte in seinen Versuchen mit Albumin-Tyrode-Lösung unter der Laktat-Infusion eine durchschnittliche Zunahme der Glukose-Produktionsrate von 1,15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ermitteln.

In unseren Versuchsserien mußte jedoch auf die Bestimmung der jeweiligen Pyruvatgehalte verzichtet werden. Obwohl Autoren wie Marbach und Weil (46) für enteivierte Proben je nach Kühltemperatur eine Aufbewahrungszeit von 6 - 42 Tagen angeben, konnten wir in den sofort deproteinierten Proben nach wesentlich kürzeren Lagerzeiten im Gefrierschrank nicht mehr die tatsächlichen Pyruvatkonzentrationen zum Abnahmezeitpunkt erfassen.

Diese Substratinstabilität gab Anlaß zu erneuten Versuchsserien (Diss. Achenbach, 2).

Wir prüften daher, ob und inwieweit das isolierte Organ in der Lage war, unter der Milchsäurebelastung einen Laktatspiegel im Medium einzuregulieren (66, 69, 68); die Einstellung des Laktatspiegels auf ein konstantes Niveau im Medium kann im isolierten System allerdings nur resultieren "wenn Lebern gefütterter, unbehandelter Ratten durchströmt werden" (69).

zu 2. a) Harnstoff

Die Elimination des im Blut anfallenden Ammoniaks erfolgt quantitativ gesehen zu einem minimalen Teil durch die Niere, grÖßtenteils jedoch durch die Leber. Die Umsetzung des Ammoniaks zu Harnstoff findet in den Lebermitochondrien statt und läuft nach folgendem Mechanismus ab:

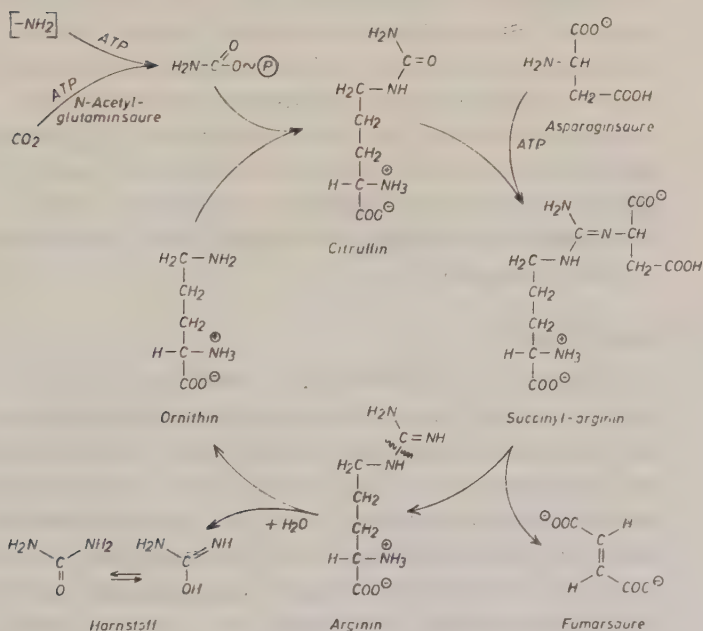


Abb. 1: Harnstoff-Zyklus (nach Karlson) (37)

Dabei werden pro Mol Harnstoff 2 Mol NH_3 benötigt. Aufgrund der Veröffentlichung von Rokà (51) untersuchten wir die Harnstoffsynthese der isoliert perfundierten Rattenleber aus exogenem Ammoniakangebot.

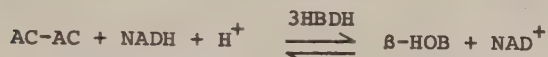
Die Elimination von NH_3 sowie die Umsetzung zu Harnstoff stellen weitgehendst resistente Funktionsabläufe bei einer Leberschädigung dar (87, 110, 111). Untersuchungen an frisch entnommenen Kadaverlebern haben ergeben, daß nach 6-stündiger Warmischämie - bei Raumtemperatur belassen - die Harnstoffsynthese sich nicht signifikant von den frisch exzidierten unterschied (110); selbst in Leberschnitten und Leberzellsuspensionen wurde noch eine geringe Harnstoffproduktion beobachtet (84), was die Aussagekraft für die Funktionsintegrität eines Organes zwar sehr einschränkt, dennoch sind die Elimination von NH_3 und die Harnstoffsynthese als wichtige Partialfunktionen der Leber wertvolle prognostische Parameter; eine deutliche Einschränkung oder Aufhebung dieser Leberfunktionen würde unter der Bedingung der Organkonservierung einen irreversiblen Schaden bedeuten (87).

zu 2. b) Ketonkörper

Die Bildung der Ketonkörper - β -HOB und AC-AC - findet wie die Harnstoffsynthese in den Mitochondrien der Leberzellen statt und beruht auf einer Störung der β -Oxydation der Fettsäuren sowie der Verwertung des Acetyl-CoA-Überangebotes. Sie kann einerseits durch Kohlenhydratmangel und Verarmung der Leber an Glykogen, andererseits durch Insulinmangel und der damit verbundenen Unfähigkeit der Leber, Glukose zu verwerten, ausgelöst werden.

Die Acetessigsäure wird durch die β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase - einem sessilen Mitochondrienenzym - mit Hilfe des Coenzyms NADH_2 teilweise reduziert, so daß im Medium ein im Gleichgewicht stehendes Gemisch von Acetacetat und β -Hydroxybutyrat vorliegt. Somit gilt der Quotient aus β -HOB und AC-AC als Indikator des mitochondrialen Redox-Systems NAD/NADH (41, 101, 81) und ist nach Krebs (41) ein geeigneter Parameter zur Beurteilung des Funktionszustandes der

Lebermitochondrien und des isoliert perfundierten Organs; denn bereits geringe Zell- und Gewebsschädigungen äußern sich in einer Verschiebung des Gleichgewichts von β -HOB und AC-AC zugunsten einer Erhöhung des β -HOB-Spiegels im Medium.



III. Material und Methodik

3.1. Perfusionsanlage

Unsere Perfusionen wurden im wesentlichen nach den von Miller (53) und Schimassek (67) angegebenen Verfahren durchgeführt. Durch die fehlende CO_2 -Absorptionsanlage handelte es sich jedoch bei unserer Versuchsanordnung um ein offenes System; ein weiterer Unterschied bestand darin, daß sich die Leber während der Perfusion nicht wie bei Schimassek in einem geschlossenen Leberbehälter befand.

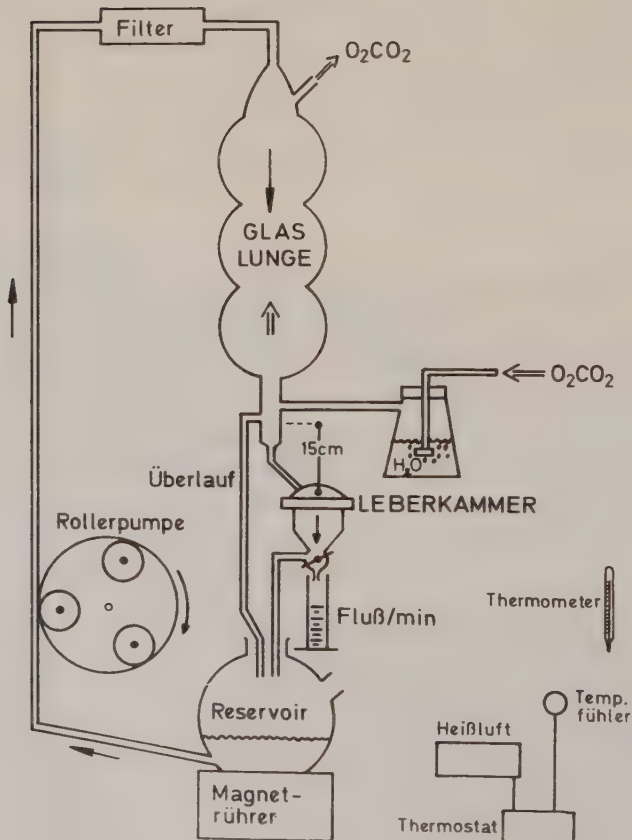


Abb. 2: Schematische Darstellung der Perfusions-
apparatur

Die Perfusionsapparatur war in einer Kammer mit verschiebbarer Glastür untergebracht. Mit Hilfe eines über einen Thermostaten gesteuerten Heizlüfters wurde die Luft in der Kammer während der Perfusionsdauer auf 37°C erwärmt. Der Temperaturfühler wurde im hiesigen Institut von Herrn Dr. Mann eigens für unsere Versuche hergestellt. Ein feuchtes Handtuch sorgte für eine maximale Wasserdampfsättigung. Eine Rollerpumpe (Watson-Marlow, Type 200) gewährleistete die kontinuierliche Rezirkulation des Mediums, das mit Carbogen - 95% O_2 und 5% CO_2 - (Fa. Messer Griesheim, Herborn) begast wurde. Die Sauerstoffanreicherung in den Erythrocyten erfolgte im Filmoxygenator im Gegenstrom. Das überschüssige Carbogen sowie CO_2 konnte aus einer oberen seitlichen Öffnung des Oxygenators in die Perfusionskammer entweichen. Die Leber wurde mit einem Perfusionsdruck von 15 cm H_2O durchströmt. Eine Magnetrühranlage (Cenco, Pyro-Mag-Stir No 34534 - 200) sorgte im Vorratsgefäß für die ständige Durchmischung des Mediums, das zu Beginn der Perfusion 120 ml betrug.

Als Schlauchmaterial dienten PVC-Schläuche, die mehrmals mit destilliertem Wasser unter Überdruck ausgespült und jeweils wieder verwandt wurden. Als Blutfilter benutzten wir die Filter des Infusionsbesteckes (Sangoflex Rekord, Fa. Braun, Melsungen).

3.2. Tiermaterial

Die Versuche ($n=33$) wurden mit männlichen Wistar-ratten im Gewicht von 336 ± 81 g durchgeführt. 24 h vor der Operation wurden die Tiere nüchtern gehalten, erhielten jedoch Wasser ad libitum.

3.3. Narkose und Operationstechnik

Als Narkosemittel wurde Aether puriss. verwandt.

Unsere Operationsmethode stützt sich auf die von Miller (53), Schimassek (70) und Breuer (33) angegebenen Verfahren.

1. Freilegung der linken Vena femoralis und Heparinisierung des Tieres durch Injektion von 0,2 ml Liquemin^(R) (Fa. Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach, Baden).
2. Eröffnung der Bauchhöhle durch Medianschnitt, beidseitigen Rippenbogenrandschnitten und Transversalschnitten im Unterbauch.
3. Doppelte Ligatur und Durchtrennung des Ösophagus sowie der Arteria gastrica sinistra.
4. Lösung der Ligamenta der Leber zu Magen, Colon, Milz und rechter Niere.
Zur besseren Übersicht wurden der Magen und Teile des Darmes weit nach links verlagert.
5. Freilegung und Kanülierung des Ductus choledochus.
(Bei späteren Versuchsserien wurde die Kanülierung unterlassen, um eine kürzere Ischämiezeit zu erreichen).
6. Anschlingen der Gefäße der Leberpforte sowie der Vena cava inf., dann periphere Unterbindung und Kanülierung der Vena portae, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, daß sich keine Luftblasen im angeschlossenen Pfortaderkatheter befanden. blieb die Spontanfüllung des Pfortaderkatheters mit Blut aus, wurde die in ihm verbliebene Luft durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt.
7. Eröffnung des Thorax und Kanülierung der Vena cava inf. vom rechten Vorhof aus unter Belassung einer wenige Millimeter bemessende Gefäßwand oberhalb des Zwerchfells.
8. Unterbindung und Durchtrennung der subhepatischen Vena cava inf. sowie vorsichtiges Freipräparieren der Leber.

9. Wiegen der Leber auf einer Präzisionswaage (Mettler P 2000).

Das weitere Vorgehen richtete sich jeweils nach den Versuchsgruppen.

3.4. "wash out" und Perfusionsmedium

1. Die Lebern der Nullserie (n=8) ohne normo- und hypothermes wash out und nachfolgender Konservierung - wurden direkt nach dem Wiegen an das rezirkulierende System angeschlossen. Der in der Pfortader befindliche Katheter stellte den Einfluß, der in der suprahepatischen vena cava inf. den Ausfluß dar.
Der Perfusionsbeginn wurde auf den Zeitpunkt der Integration der jeweiligen Leber in das Perfusionssystem festgelegt.
2. Alle Lebern der Konservierungsgruppe (n=20) wurden noch "in situ" über den Portalkatheter an eine Infusionspumpe ("Infusor Fa. Braun, Melsungen) angeschlossen und eine Minute lang mit ca. 5 ml Ringer-Laktat-Lösung (RLL der Fa. Braun, Melsungen) von 24° - 25°C ausgewaschen. Dann folgte eine dreiminütige Perfusion der Lebern mit eisgekühlter RLL (ca. 27 ml) zur Herabsetzung der Stoffwechselvorgänge. Entsprechend der jeweiligen Versuchsgruppen wurden die isolierten Organe anschließend unterschiedliche Zeiten (2 Std. n=7, 4 Std. n=7, 8 Std. n=6) in einer feuchten Kammer im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Durch diese zweiphasige Initialperfusion der zu konservierenden Lebern sollten Gefäß- und Kapillarspasmen, die zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation führen würden, verhindert und eine homogenere Auswaschung der Lebern erreicht werden.

Die Dauer der normothermen Ischämie betrug bei allen Versuchsdurchführungen ohne Konservierung 14 Min. $\pm$ 5 Min. Diese relativ lange Zeit erklärt sich daraus,

daß die Lebern nach der Kanülierung aus dem Organismus gelöst und dann an das Perfusionssystem angeschlossen werden mußten. Hingegen verringerte sich die Warm-Ischämiezeit bei den zu konservierenden Organen durch die Initialperfusion "in situ" um 4 Min. + 2 Min.

Perfusionsmedium:

Als Perfusionsmedium verwandten wir ein halb-synthetisches Medium (70, 71): Tyrode-Lösung mit dreifach in physiologischer Kochsalzlösung gewaschener Erythrocyten überalteter Human-Blutkonserven (Alter 3-4 Wochen) als Sauerstoffträger. Rinderalbumin (reinst, Behring-Werke, Marburg) wurde als kolloidosmotischer Anteil zugesetzt.

Zusammensetzung des Mediums

S. Albumin-Tyrode-Lösung Tab. 1, S.9

Auf Terramycin wurde verzichtet.

Die Einstellung des pH-Wertes (pH-Meter: Corning EEL, Modell 12) erfolgte zu Beginn der Perfusion auf 7,4 mit 1n NaOH, wurde jedoch während der Perfusionsdauer nicht nachjustiert. Gegen Ende der Versuchsdauer ergaben Nachmessungen einen pH-Wert von 7,1 - 7,2.

3.5. Versuchsdurchführung

Nach Anschluß der Leber an das Perfusionssystem wurden die ersten 20 ml, die das isolierte Organ durchströmten, verworfen. Die Perfusionsdauer betrug 105 Minuten. Während dieser Zeit erfolgte die Perfusion mit einem Medium, das im Oberflächen-oxygenator mit Carbogengas gesättigt wurde, unter einem hydrostatischen Druck von 15 cm.

Nach 30 Minuten erfolgte die stoßweise Gabe von NH_4Cl und Ornithin sowie die Infusion von Laktat über eine Infusionspumpe in das Vorratsgefäß. Durch

VERSUCHSABLAUF DER RATTENLEBERPERFUSION

(Tyrodelösung • Humanerythrozyten • Rinderalbumin)

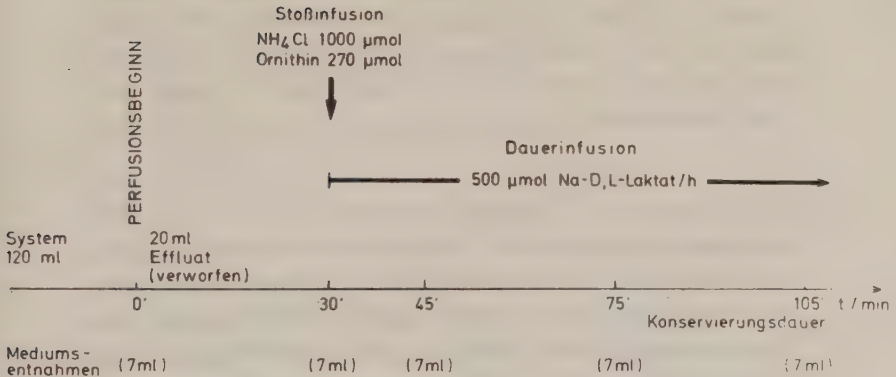


Abb. 3: Schema des Versuchsablaufes

die Zugabe von Ornithin sollte aufgrund der Untersuchungsergebnisse von Krebs (29) eine verbesserte Harnstoffsyntheserate zu erzielen sein.

Die Mediumsprobe von 7 ml vor Anschluß der Leber diente als Ausgangswert. Es folgten weitere Abnahmen von je 7 ml: nach 30, 45, 75 und 105 Minuten.

Wir wählten die erwähnten Abnahmezeiten, um zum Zeitpunkt 0 Min. einen Ausgangswert zu bekommen und ließen das System dann zur Stabilisierung 30 Min. ohne weitere Entnahmen laufen. Mit der Probenahme nach 45 Min. sollte der frühe Gipfel - 15 Min. nach der Stoßgabe von NH₄Cl und Ornithin sowie Laktatbelastung - erfaßt werden, während die zwei folgenden

Proben in gleichen Abständen - 75 und 105 Min. - der Kontrolle des weiteren Verlaufs der Perfusion dienten.

Personelle und technische Schwierigkeiten im Labor ließen eine Ausdehnung des Versuchsablaufs über diese Zeitdauer nicht zu.

Die jeweiligen Proben wurden dem Vorratsgefäß entnommen, je nach zu bestimmendem Substrat sofort enteiweißt und zentrifugiert (10 Min. bei 3.000 U/Min.). Das dem Medium entnommene Volumen wurde während der Perfusionsdauer nicht ersetzt.

3.6. Gruppen

Die vorliegende Arbeit umfaßt vier Versuchsserien, die unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde in Einzelversuchen das Verhalten der Ketonkörper unter dem Einfluß der Milchsäure- und Ammoniak- sowie Ornithin-Belastung geprüft.

Der Anschluß der Lebern erfolgte nach Entnahme aus dem Spenderorganismus an das rezirkulierende System in:

- Gruppe I: ohne Initialperfusion (normo- und hypothermes "wash-out") und ohne vorherige Konservierung
 (n=8)
- Gruppe II: nach Initialperfusion und zweistündiger hypothermer Lagerung
 (n=7)
- Gruppe III: nach Initialperfusion und vierstündiger hypothermer Lagerung
 (n=7)
- Gruppe IV: nach Initialperfusion und achtstündiger hypothermer Lagerung.
 (n=6)

3.7. Standardbelastungen zur Erfassung der Leberfunktionen

Zur Prüfung der Funktionsfähigkeit der Lebern wurden sie in den Gruppen I bis IV folgenden Standardbelastungen unterzogen:

30 Minuten nach Perfusionsbeginn wurden die Lebern mit einer einmaligen Stoßgabe von 1000 $\mu\text{mol NH}_4\text{Cl}$ und 270 $\mu\text{mol Ornithin}$ belastet. Zum gleichen Zeitpunkt wurde zusätzlich eine Dauerinfusion von Laktat - 500 $\mu\text{mol/h}$ - angeschlossen (Pumpe: "Infusor", Fa. Braun, Melsungen).

3.8. Zusätzliche Einzeluntersuchungen

Zur Prüfung, ob und inwieweit der β -HOB-Abfall im Medium nach den Standardbelastungen substratabhängig war, wurden Einzelversuche über das Verhalten der Ketonkörper durchgeführt. Sie erfolgten ohne Initialperfusion und ohne vorherige Konservierung. Die Standardbelastungen wurden dabei variiert:

- a) 1000 $\mu\text{mol NH}_4\text{Cl}$ -Stoß + 270 $\mu\text{mol Ornithin}$
ohne Laktat-Infusion
- b) 1000 $\mu\text{mol NH}_4\text{Cl}$ -Stoß + 500 $\mu\text{mol/h}$ Laktat-Infusion
ohne Ornithin
- c) 1000 $\mu\text{mol NH}_4\text{Cl}$ -Stoß + 270 $\mu\text{mol Ornithin}$ +
500 $\mu\text{mol/h}$ Laktat-Infusion
zusätzlich: 1000 $\mu\text{mol/h NH}_4\text{Cl}$ -Infusion
- d) 1000 $\mu\text{mol NH}_4\text{Cl}$ -Stoß + 270 $\mu\text{mol Ornithin}$
zusätzlich: 1000 $\mu\text{mol/h NH}_4\text{Cl}$ -Infusion ohne
Laktat-Infusion

3.9. Sonstiges

Bestimmungen des Plasma-Hämoglobins wurden nicht durchgeführt, da das mikroskopische Bild keine Hämolyse erwarten ließ.

3.10. Biochemische Analysen

Die Mediumsproben wurden auf folgende Substrate untersucht: Harnstoff, Glucose, Lactat sowie Ketonkörper: Hydroxybutyrat und Azetazetat.

Die Bestimmungen der Substrate Glucose, Lactat, β -HOB und AC-AC erfolgten aus dem enteweißten und neutralisiertem Serumextrakt, während Harnstoff direkt aus dem Serum bestimmt wurde.

Zur Bestimmung von Harnstoff und Glucose dienten Farbreaktionsmethoden; Lactat, β -HOB und AC-AC wurden im enzymatisch optischen Test nach O. Warburg gemessen. Die Konzentrationsangaben wurden auf den tatsächlichen Metabolitgehalt des Mediums in $\mu\text{mol pro ml}$ umgerechnet; für die Substrate Harnstoff und Glucose wurden zusätzlich die Konzentrationsdifferenzen zwischen zwei Entnahmezeiten jeweils auf 1 g Leber pro Minute bezogen ($\Delta \mu\text{mol/g Lebergewicht/Min}$).

Alle photometrischen Bestimmungen erfolgten mit dem Eppendorf^(R)-Photometer Nr. 1101 M und - soweit erforderlich - mit dem dazugehörigen Kompensationsschreiber Nr. 6511.

3.10.1. Bestimmung der Glukose-Konzentration

Die Bestimmung der Glukosekonzentration wurde mit der GOD-Perid-Methode der Fa. Boehringer Mannheim GmbH (Best. Nr.15 755) durchgeführt. Das Prinzip dieser Bestimmung besteht in der Oxydation von Glucose zu Gluconsäure mittels Glucoseoxydase. Das dabei entstandene Wasserstoffperoxid wird durch Peroxidase zersetzt und der freigesetzte Sauerstoff reagiert unter Bildung eines grünen Farbstoffes, dessen Intensität der Glukosekonzentration der Probe proportional ist. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels eines Standards; die Angaben in $\mu\text{mol/ml}$.

Ausführung

Zur Enteiweißung wurden 0,5 ml 0,33 N HClO_4 mit 0,05 ml Medium gemischt und 10 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert. In den Leerwert wurden 0,1 ml bidest. Wasser, in den Standard 0,1 ml Lösung 1 (9,1 mg% Glukose), in die Probe 0,1 ml des enteweißten Überstandes pipettiert. In alle drei RG wurden je 5 ml Lösung 2. (0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,0; 20 μg POD/ml; 180 μg GOD/ml; 0,5 mg ABTS/ml) gefüllt. Nach gutem Mischen wurden die Analysen 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Extinktion des Standards und der Probe wurden bei einer Wellenlänge von 436 nm in einer Glasküvette von 1 cm Schichtdicke gegen die Extinktion des Leerwertes gemessen.

Die Glukosekonzentration wurde aus dem Quotienten

$$\frac{E_p}{E_{\text{St}}} \text{ multipliziert mit dem Faktor } 5,55 = \\ c_{\text{Glucose}} \text{ in } \mu\text{mol/ml}$$

3.10.2. Bestimmung der Laktat-Konzentration

Diese Bestimmung erfolgte mittels der Test-Kombination der Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Best.Nr. 15972. Die Bestimmungsmethode beruht auf der enzymatischen Überführung von L-Laktat zu Pyruvat unter der Einwirkung der Laktatdehydrogenase, wobei NAD zu NADH reduziert wird.



Die Menge des entstandenen NADH ist der Laktatkonzentration der Probe proportional und wird als Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 366 nm photometrisch gemessen. Die Angabe erfolgte in $\mu\text{mol/ml}$.

Ausführung

0,25 ml Medium wurden mit 0,5 ml 0,6 N HClO_4 enteweißt und 10 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert.

In Leerwert und Probe wurde je 1 ml Lösung 1 (0,5 M Glycinpuffer, pH = 9,0; 0,4 M Hydrazin) pipettiert; dann werden dem Leerwert 0,1 ml HClO_4 (0,6 N), der Probe 0,1 ml des Überstandes nach Enteiweißung, allen RG 0,1 ml Lösung 2 (27 mM NAD) und 0,01 ml Suspension 3 (2mg LDH/ml) zugesetzt, gemischt und 60 Minuten bei 25°C inkubiert.

Anschließend wurde der Inhalt der RG in Halbmikro-küvetten gefüllt und die Extinktion der Probe und des Leerwertes bei 366 nm gegen Luft gemessen. Der Lactatgehalt errechnete sich aus der Differenz:

$$E_P - E_L = \Delta E \text{ multipliziert mit dem Faktor } 10,44 = \\ c_{\text{Lactat}} \text{ in } \mu\text{mol/ml}$$

3.10.3. Bestimmung der Harnstoffkonzentration

Die Bestimmung der Harnstoffkonzentration wurde im Serum nach der Phenol-Hypochlorit-Methode der Fa. Boehringer, Mannheim GmbH (Best.Nr. 15 954) durchgeführt.

Dabei wird Harnstoff mittels Urease enzymatisch zu Ammoniak umgewandelt (Berthelot-Reaktion), der mit Phenol und Hypochlorit zu einem blauen Farbstoff reagiert. Die Intensität des Farbstoffes ist der Menge des entstandenen Ammoniaks und somit auch der Harnstoffkonzentration der Probe proportional.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels eines Standards; die Angaben in $\mu\text{mol/ml}$. Zur Eliminierung des den Proben exogen zugesetzten Ammoniaks diente jeweils eine Probe ohne Ureasebehandlung als eigener Leerwert.

Ausführung

In Leerwert, Standard und Probe wurden je 0,1 ml Suspension 1 (2 mg/ml Urease, 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,5), in den Standard 0,2 ml Lösung 2 (3 mg% Harnstoff), in die Probe 0,02 ml Serum gegeben.

Nach gutem Mischen wurden die RG mit einem Stopfen verschlossen und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Probe mit 0,02 ml Serum ohne Urease zur Bestimmung der freien NH₄-Ionen ange-
setzt.

Danach wurden in alle RG 5 ml Lösung 3 (0,106 M Phenol; 0,17 mM Nitroprussid-Na) und 5 ml Lösung 4 (11 mM Natriumhypochlorid; 0,125 n NaOH) gegeben und bei 37°C 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Die Extinktion wurde mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 546 nm in einer Glasküvette von 1 cm Schichtdicke gegen den Leerwert gemessen.

Die Harnstoffkonzentration errechnete sich aus dem Quotienten:

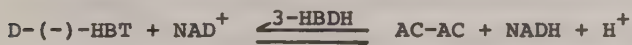
$$\frac{E_P - E_{NH_4^+}}{E_{St} - E_L} = \frac{E_{P'}}{E_{St'}} \quad \text{multipliziert mit dem Faktor 5 =}$$

C_{Harnstoff} in ,umol/ml

3.10.4. Bestimmung der Hydroxybutyrat-Konzentration

Die Bestimmung von Hydroxybutyrat (HBT = HOB) erfolgte nach dem Verfahren der Fa. Boehringer, Mannheim GmbH in Anlehnung an die Methode von H.U.Bergmeyer und E. Bernt (5).

Die Reaktion beruht auf der Überführung von Hydroxybutyrat in Azetazetat mittels der Hydroxybutyratdehydrogenase; dabei wird NAD zu NADH reduziert.



NADH dient aufgrund seiner Absorption bei der Wellenlänge von 366 nm als Meßgröße. Die Zunahme der NADH-Menge ist äquivalent der Hydroxybutyratkonzentration. Die Angabe erfolgte in ,umol/ml.

Herstellung der erforderlichen Lösungen

1. Kaliumhydroxid/Kaliumcarbonat (0,4N KOH p.a.;
0,13 M K_2CO_3 p.a.) (Fa. Merck, Darmstadt):
2.24 g KOH und 1,8 g K_2CO_3 in ca. 50 ml bidest.
Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.
2. Nicotinamid-adenin-dinucleotid (25 mM 8-NAD)
(Fa. Boehringer, Mannheim GmbH):
95 mg NAD in 5,0 ml bidest. Wasser lösen.
3. 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (5mg 3-HBDH/ml)
(Fa. Boehringer Mannheim GmbH):
Enzymsuspension unverdünnt verwenden.
4. Perchlorsäure (0,7 N $HClO_4$) (Fa. Merck, Darmstadt):
6 ml 70%ige $HClO_4$ mit bidest. Wasser auf 100 ml
verdünnen.

Ausführung

Zur Enteiweißung wurden 1,5 ml 0,7 N $HClO_4$ mit
1,5 ml Medium gemischt und 10 Minuten bei 3000 U/Min.
zentrifugiert. Von dem enteiweißten Überstand wurde
1 ml mit 0,5 ml der Lösung 1 (KOH/K_2CO_3) versetzt,
30 Minuten im Eisbad stehen gelassen und wiederum
zentrifugiert.

Der neutralisierte Überstand wurde auf 37°C ge-
bracht und der pH mit 10%iger NaOH auf 9,2 - 9,5
eingestellt; 1 ml davon wurde in eine Halbmikroküvette
pipettiert und mit 0,1 ml Lösung 2 (NAD) versetzt.
Bei Stillstand der Reaktion Extinktion E_1 gemessen,
danach mit 0,01 ml Suspension 3 (3-HBDH) gemischt,
bei 37°C im Wasserbad 30 Minuten inkubiert und
bei Stillstand der Reaktion Extinktion E_2 gemessen.
Die HBT-Konzentration errechnete sich aus der
Differenz:

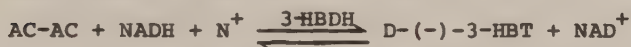
$$E_2 - E_1 = \Delta E \text{ multipliziert mit dem Faktor } 0,9324 =$$

$C_{\text{Hydroxybutyrat}}$ in $\mu\text{mol/ml}$.

3.10.5. Bestimmung der Azetazetat-Konzentration

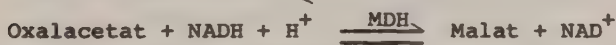
Die Bestimmung von Azetazetat erfolgte ebenfalls nach dem Verfahren der Fa. Boehringer Mannheim GmbH in Anlehnung an die Methode von H.U. Bergmeyer und E.Bernt (5).

Das Prinzip dieser Bestimmungsmethode beruht auf der Überführung von Azetazetat in Hydroxybutyrat unter Beteiligung der Hydroxybutyratdehydrogenase, wobei NADH zu NAD oxydiert wird.



Die Abnahme von NADH ist der Azetazetat-Konzentration proportional und wird photometrisch bei 366 nm gemessen. Die Angaben erfolgten in $\mu\text{mol/ml}$.

Wegen möglicher Verunreinigungen der 3-HBDH mit Laktat- und Malat-Dehydrogenase ist es notwendig, im Blut vorhandenes Pyruvat und Oxalacetat vor Beginn der Bestimmung durch Zugabe der Enzyme LDH und MDH zu entfernen:



Herstellung der Lösungen

1. Trikaliumphosphat-Lösung (1,6 M K_3PO_4):
40,0 g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ in ca. 50 ml bidest. Wasser lösen und auf 100 ml auffüllen.
2. NADH (2.2 mM):
20 mg NADH-NA_2 in 10 ml bidest. Wasser lösen.
3. LDH/MDH (je 5 mg Enzymprotein/ml):
0,1 ml LDH (5 mg/ml) mit 0,1 ml MDH (5mg/ml) mischen und mit 0,8 ml 3,2 M Ammoniumsulfat-Lösung verdünnen.
4. 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (5 mg 3-HBDH/ml):
Enzymsuspension unverdünnt verwenden.

5. Perchlorsäure (0,7 N HClO_4):

6 ml 70%ige HClO_4 mit bidest. Wasser auf 100 ml verdünnen.

Ausführung

Zur Enteiweißung wurden 2 ml 0,7 N HClO_4 mit 2 ml Medium gemischt und 10 Minuten bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Von dem enteiweißten Überstand wurden 2 ml mit 0,2 ml Lösung 1 (K_3PO_4) versetzt, 30 Minuten im Eisbad stehen gelassen und wiederum zentrifugiert. Der pH-Wert des auf 25°C erwärmten neutralisierten Überstandes wurde mit 10%iger NaOH auf 6,8 - 7,0 eingestellt. Dann wurde 1 ml davon in eine Halbmikroküvette pipettiert und mit 0,1 ml Lösung 2 (NADH) versetzt, bei Stillstand der Reaktion Extinktion E_1 gemessen, sodann 0,01 ml der Suspension 3 (LDH/MDH) hinzugefügt, gemischt und über einen Zeitraum von 10 Minuten in Abständen von 2 Minuten Extinktion E_2 gemessen und auf die Zeit der LDH/MDH-Zugabe extrapoliert ($E_1 - E_2$) = $\Delta E_{\text{Pyruvat}}$ bzw.
 $(E_1 - E_2) = \Delta E_{\text{Oxalacetat}}$

Danach wurden 0,01 ml der Suspension 4 (3-HBDH) zugegeben, gemischt und nach 20 Minuten während 10 Minuten im 2-Minuten Rhythmus Extinktion E_3 gemessen. E_3 wurde auf die Zeit der Zugabe der 3-HBDH-Suspension extrapoliert.

Die Acetacetat-Konzentration ergab sich aus der Differenz:

$$\begin{aligned} E_2 - E_3 &= \Delta E \text{ multipliziert mit dem Faktor } 0,6899 \\ &= c_{\text{Acetacetat}} \text{ in } \mu\text{mol/ml.} \end{aligned}$$

3.11. Statistische Berechnungen

3.11.1. Mittelwert und Standardabweichung

Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen wurden statistischen Berechnungen unterzogen. Für die Werte, die sich zu standardisierten Zeiten (0, 30, 45, 75 und 105 Minuten) ergaben, wurden das arithmetische Mittel und Standardabweichungen durch programmiertes Rechnen (Rechenmaschine: Diehl Combitron S) nach folgenden Formeln ermittelt:

$$\text{Mittelwerte } \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^5 x_i}{n}$$

Standardabweichung:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left[\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right]}$$

Meßwerte x_i ($i = 1, 2, \dots, n$)

$\sum x$ = Summe der Meßwerte

n = Anzahl der Meßwerte

S = Standardabweichung

$\sum (x - \bar{x})^2$ = Summe der Quadrate der Abweichungen
vom arithmetischen Mittel

(Anleitung Rechenmaschine Diehl Combitron S,
Nürnberg, S. 36)

3.11.2. Duncan-Test für abhängige Daten

Die Meßergebnisse in den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des Duncan-Testes (107) untereinander verglichen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ ($p < 0,05$) war die Differenz der Mittelwerte signifikant, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 1\%$ ($p < 0,01$) hoch signifikant.

3.11.3. t-Test nach Student

Ferner wurden die Ergebnisse der einzelnen Versuchsserien (direkter Anschluß des isolierten Organs an das Perfusionssystem, nach vorheriger 2-, 4- und 8-stündiger hypothermer Lagerung) untereinander mit Hilfe des t-Tests nach Student für nicht korrelierende Daten verglichen. Auch hier war die Differenz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ ($p < 0,05$) und $<1\%$ ($p < 0,01$) - beim Duncan-Test - signifikant bzw. hoch signifikant.

Die statistischen Berechnungen wurden in der Marburger Zentralen Rechenanlage (ZRA) durchgeführt. Insbesondere danken wir Herrn P. Zoefel für die hilfreiche Unterstützung und Durchführung der genannten Berechnungen.

IV. Vorversuche

Zur Optimierung der gesamten Methodik, wie günstige Operationszeiten, Erreichung einer möglichst kurzen Ischämiezeit fanden Einzeloperationen an Ratten ohne nachfolgenden Perfusionsanschluß der jeweiligen Leber statt (Pilot-studies).

Die folgenden Versuche wurden dann unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, eine Ausnahme bildete der Laktatzusatz. Hier wurde dem Perfusionsmedium der Gruppen II b, III und IV die doppelte Menge an Laktat zugesetzt.

In die biochemischen Bestimmungsmethoden wurde die Verfasserin durch eine allein auf wissenschaftliche Untersuchungen angesetzte MTA mit jahrelanger Berufserfahrung eingewiesen. Im Verlauf von Doppelversuchen und Recovery-Tests wurden annähernd identische Werte für die zu bestimmenden Substanzen mit der MTA des wissenschaftlichen Labors erreicht. Außer der MTA und der Verfasserin führte keine dritte Person biochemische Bestimmungen durch. Weitergehende Qualitätskontrollen auf Präzision und Richtigkeit wurden nicht durchgeführt.

V. Ergebnisse

5.1. Glukose

In unseren Versuchsserien zeigte sich in den ersten belastungsfreien 30 Versuchsminuten (0 - 30 Min.) in allen Gruppen eine signifikante Glukose-Konzentrationserhöhung (Gruppe I bis III: $p < 0,01$; Gruppe IV: $p < 0,05$) im Medium. Nach 30 Minuten ergaben die gemeinsamen Meßdaten einen Mittelwert aller Gruppen von $108 \text{ mg/\%} = 5,42 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ (Tab. 2, Abb. 4). Daß bereits in den ersten 30 Minuten in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg der Glukosekonzentration gegenüber dem Ausgangsmedium zu beobachten war, spricht für die Bestrebung der isoliert perfundierten Organe, den niedrigen gemessenen Blutzuckerspiegel im Ausgangsmedium von durchschnittlich $3,8 \text{ } \mu\text{mol}$ auf $5,42 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ zu erhöhen und kann als lebereigene Regelleistung gewertet werden. Die Frage, ob es sich dabei um die Mobilisation der Glykogenreserven der Leber handelte oder die Substraterhöhung im Medium auf die Glukoneogenese von Laktat zurückzuführen war, konnte nicht eindeutig beantwortet werden, da unsere Versuchsserien keine quantitativen Glykogenbestimmungen beinhalteten. Aufgrund der Veröffentlichungen, daß bereits nach 12-stündiger Hungerperiode die Lebern der Ratten praktisch als glykogenfrei anzusehen seien (21), ist anzunehmen, daß es sich hier - nach 24-stündiger Nahrungskarenz - um eine Glukosekonzentrationserhöhung aufgrund der Glukoseneubildung aus Laktat handeln dürfte. Für diese Annahme spricht auch die Abnahme der Laktatkonzentration im Medium während des genannten Zeitraumes (Tab. 4).

Für die Gruppen I und II beobachteten wir bis zum Versuchsende unter der Laktatbelastung ein kontinuierliches Ansteigen der Glukosekonzentration im Medium (Abb. 4, Tab. 2).

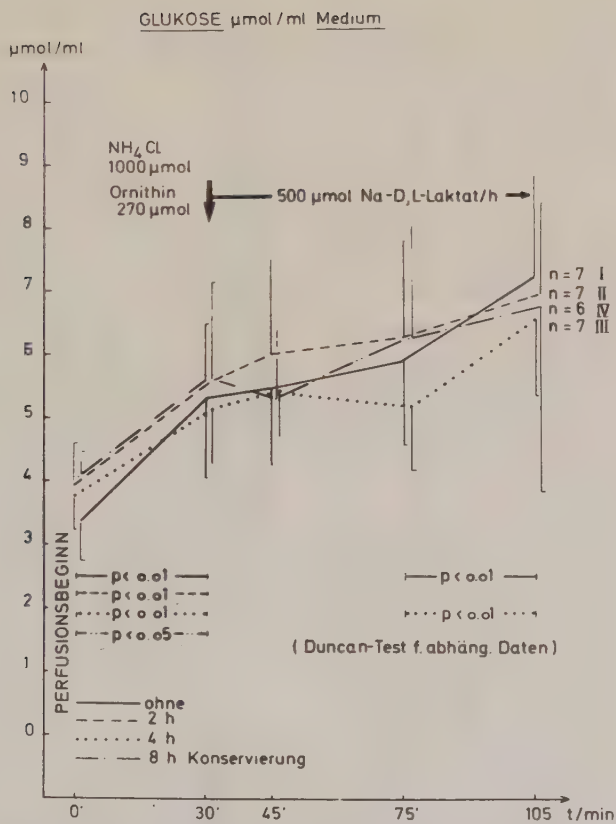


Abb. 4

Tab. 2

(Mittelwerte und Standardabweichungen)

Glukose / $\mu\text{mol/ml}$ Medium	0'	30'	45'	75'	105'
1. ohne Konservierung	3,30 $\pm$ 0,58	5,34 $\pm$ 1,28	5,47 $\pm$ 1,27	5,91 $\pm$ 1,36	7,27 $\pm$ 1,60
2. 2 h Konservierung	3,97 $\pm$ 0,65	5,54 $\pm$ 0,94	6,03 $\pm$ 1,57	6,28 $\pm$ 1,54	6,98 $\pm$ 1,49
3. 4 h Konservierung	3,78 $\pm$ 0,51	5,09 $\pm$ 0,85	5,43 $\pm$ 0,76	5,16 $\pm$ 1,00	6,55 $\pm$ 1,20
4. 8 h Konservierung	4,05 $\pm$ 0,40	5,62 $\pm$ 1,52	5,31 $\pm$ 1,28	6,25 $\pm$ 1,79	6,75 $\pm$ 2,94

Tab. 3

(Mittelwerte und Standardabweichungen)

Glukose Δ / $\mu\text{mol/g}$ Lebergew./Min.	0' $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$ 30' $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$ 45' $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$ 75' $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$ 105'
1. ohne Konservierung	0,59 $\pm$ 0,23 0,06 $\pm$ 0,21 0,11 $\pm$ 0,16 0,33 $\pm$ 0,28
2. 2 h Konservierung	0,46 $\pm$ 0,19 0,48 $\pm$ 0,42 0,02 $\pm$ 0,10 0,31 $\pm$ 0,39
3. 4 h Konservierung	0,31 $\pm$ 0,15 0,21 $\pm$ 0,35 -0,03 $\pm$ 0,22 0,29 $\pm$ 0,20
4. 8 h Konservierung	0,51 $\pm$ 0,40 -0,20 $\pm$ 0,56 0,29 $\pm$ 0,34 0,14 $\pm$ 0,43

Sowohl für die Gruppe III als auch IV ergab sich ein temporärer Glukoseabfall (III: zwischen 45 und 75 Min. um 5%; IV: zwischen 30 und 45 Min. um 5,5%), der jedoch innerhalb der folgenden 30 bzw. 15 Minuten wieder zu einem Anstieg führte. Wahrscheinlich handelte es sich hier um einen vorübergehend erhöhten Energiebedarf der Lebern (z.B. Harnstoffsynthese), den sie zunächst nicht imstande waren, zu decken und somit auf das exogene Glukoseangebot im Medium angewiesen waren. Gemäß der Meßdaten ergab sich, daß jeweils die Einregulierung des Blutzuckergehaltes auf einen auch von anderen Autoren (52) ermittelten Wert gleicher Größenordnung von 5,42 $\mu\text{mol/ml}$ angestrebt wurde, unter der Laktatbelastung kommt es darüberhinaus in allen Gruppen - insgesamt betrachtet - jedoch zur zusätzlichen Glukoseneubildung entsprechend einer gluconeogenetischen Funktionsleistung der Leber. Unter dem Stimulationseinfluß der Laktatinfusion ergab sich für die einzelnen Gruppen folgende Glukosesteigerung im Medium: (Δ Glukose von der 30. - 105. Min.)

Gruppe	Glukosezunahme 30.-105. Min.	Signifikanz 30.-105.Min.
I	36,1 %	(p < 0,01)
II	25,9 %	(p < 0,01)
III	26,2 %	(p < 0,01)
IV	20,1 %	nicht signifikant

Vergleiche der einzelnen Gruppenmittelwerte zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten untereinander nach dem t-Test (Student) ergaben keine signifikanten Unterschiede für die unterschiedlichen Konservierungszeiten.

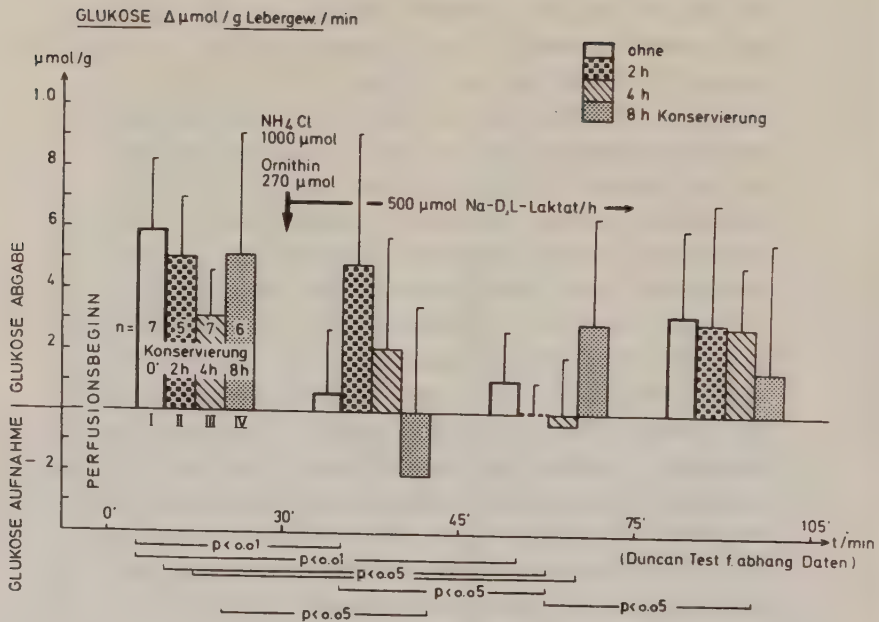


Abb. 5

Abb. 5 und Tab. 3 stellen die Glukoserynthese der isolierten Organe bezogen auf Gramm/Lebergewicht gemessen als $\Delta \mu\text{mol/Min.}$ zur Einregulierung des Blutzuckerspiegels sowie unter der Belastung der Laktatinfusion dar.

Da die Leberfunktion in der Konstanthaltung des Blutzuckerspiegels im Medium besteht, schwankt mit unterschiedlicher Lebergröße auch die Leistung der Leber pro Gramm und Minute. Darin finden auch die großen Streubreiten ihre Erklärung.

In allen Gruppen ist zwischen 0 und 30 Min. eine Glukoseabgabe an das Medium zu verzeichnen. Nach der 1. Periode der Laktatbelastung (30-45. Min.) geben die Gruppen I-III weiterhin Glukose an das Medium ab, während in Gruppe IV eine Glukoseaufnahme aus dem Medium erfolgte entsprechend dem Abfall und Kurvenverlauf dieser Gruppe in Abb. 5; im 3. Intervall (45.-75. Min.) kommt es in Gruppe I, II und IV zu einer Glukoseabgabe an das Medium, wobei in Gruppe II sie sich gegenüber dem 2. Intervall signifikant ($p < 0,05$) verringerte. Gruppe III dagegen zeigte eine Tendenz zur Glukoseaufnahme aus dem Medium.

Im 4. Intervall (75.-105. Min.) ist in allen Gruppen eine Glukoseabgabe an das Perfusionsmedium zu beobachten, wobei in Gruppe III eine statistisch signifikante Erhöhung auf dem 5% Niveau gegenüber dem 3. Intervall zu verzeichnen war.

Nach dem t-Test (Student) ergaben sich für die Gruppenmittelwerte zu den genannten Zeitintervallen statistische Signifikanzen lediglich auf dem 5% Niveau, im 1. Intervall zwischen Gruppe I und III sowie im 2. Intervall zwischen Gruppe I und II.

Die vorherrschende Tendenz der isoliert perfundierten Lebern zur Glukose-Abgabe an das Medium (Abb. 5) und der damit verbundenen Erhöhung des Substratspiegels gemessen vom Perfusionsbeginn bis zur 105. Versuchsminute (Abb. 4) ist als gluconeogenetische Funktionsleistung der Lebern zu werten, wobei auch nach Erreichen eines Substratspiegels von durchschnittlich $5,42 \mu\text{mol/ml}$, wie auch andere Autoren fanden (52) das exogene Laktatangebot in Form einer Dauerinfusion (30.-105. Min.) zu einer weiteren signifikanten Glukoseabgabe an das Medium führte.

5.2. Laktat

Die Pyruvatbestimmungen wurden durchgeführt, aber aus vorgenannten methodischen Gründen (s. S.10) nicht mit in die Arbeit aufgenommen; ebenso mußte auch auf den L/P-Quotienten verzichtet werden.

In unseren Versuchsserien beobachteten wir im Gegensatz zu Schimassek (68) vom Perfusionsbeginn bis zur 30. Versuchsminute in allen Gruppen eine deutliche Konzentrationsabnahme des Laktats im Medium (Gruppe I: $p < 0,01$). (Abb. 6, Tab. 4)

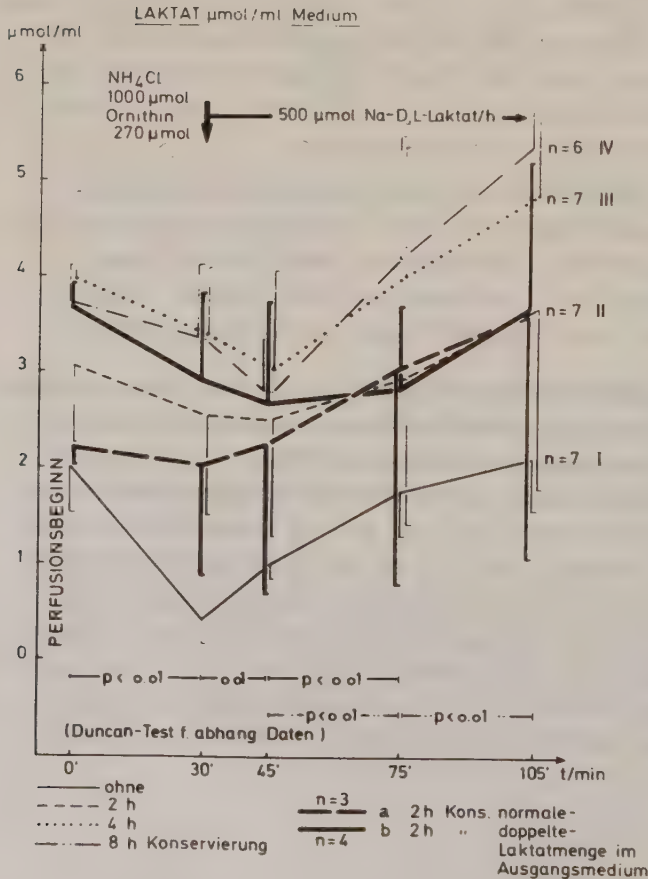


Abb. 6

Tab. 4

(Mittelwerte und Standardabweichungen)

Laktat / $\mu\text{mol/ml}$ Medium	0'	30'	45'	75'	105'
1. ohne Konservierung	$2,03 \pm 0,47$	$0,45 \pm 0,25$	$1,02 \pm 0,13$	$1,76 \pm 0,49$	$2,10 \pm 0,54$
2. 2 h Konservierung					
a)	$2,26 \pm 0,21$	$2,05 \pm 1,17$	$2,37 \pm 1,59$	$3,04 \pm 2,37$	$3,61 \pm 2,60$
b)	$3,69 \pm 0,31$	$2,94 \pm 0,90$	$2,69 \pm 1,08$	$2,85 \pm 0,87$	$3,68 \pm 1,56$
c)	$3,08 \pm 0,80$	$2,56 \pm 1,04$	$2,55 \pm 1,20$	$2,93 \pm 1,51$	$3,65 \pm 1,87$
3. 4 h Konservierung	$4,00 \pm 0,88$	$3,41 \pm 0,68$	$3,05 \pm 1,01$	$3,97 \pm 1,40$	$4,84 \pm 1,67$
4. 8 h Konservierung	$3,74 \pm 0,38$	$3,34 \pm 0,77$	$2,77 \pm 0,57$	$4,21 \pm 1,27$	$5,39 \pm 1,40$

a) normale Laktatausgangskonzentration

b) doppelte Laktatausgangskonzentration

c) a + b

Erst im weiteren Versuchsverlauf kam es nach Anschluß der Laktatinfusion (30. Min.) in den Gruppen I und II a zu einer steigenden Konzentration im Medium, während in den Gruppen II b, III und IV sich bis zur 45. Versuchsminute ein weiterer Abfall der Laktatkonzentration abzeichnete; nach der 15. Belastungsminute (45. Versuchsminute) konnten wir für diese Gruppen ebenfalls einen Anstieg der Laktatkonzentration im Medium bis zum Perfusionsende ermitteln. Der hohe Laktatumsatz der Lebern, der sich im Absinken des Konzentrationsspiegels im Medium äußerte, ließ keine eindeutige Beurteilung zu, da hierzu das Verhalten des Pyruvats sowie des Quotienten beider Substrate, die chemisch im Gleichgewicht stehen, erforderlich gewesen wäre.

Einerseits könnte der hohe Umsatz im erhöhten "Brennstoffbedarf", der isolierten Organe begründet sein, andererseits könnte er mit Beginn der Perfusion Ausdruck einer verbesserten Sauerstoffversorgung der Leberzellen sein und damit eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des Pyruvats darstellen. Unabhängig von der Laktatausgangskonzentration im Medium - wie auch Schimassek (68) beobachtete - zeigte sich in Gruppe II, die sich aufgrund der Anfangskonzentrationen in zwei Gruppen teilte (a: normale Laktatausgangsmenge; b: doppelte Laktatausgangsmenge), daß weitgehendst die Stoffwechsellage der Lebern regulierend auf die Laktatkonzentration im Medium wirkte. Trotz der großen Ausgangsdifferenzen näherten sich die Kurvenverläufe von IIa und II b einander und wiesen ab der 63. Versuchsminute (33. Min. nach Infusionsanschluß) bis zum Perfusionsende einen fast identischen Verlauf auf (Abb. 6a).

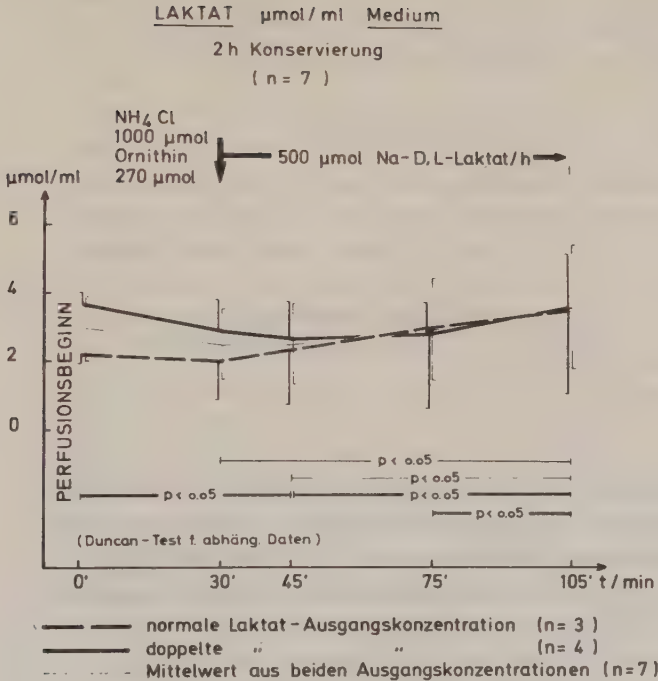


Abb. 6 a

Diese Tendenz zur Einregulierung auf ein gemeinsames Niveau spricht für einen Kontroll- oder Regelmechanismus, den die Lebern auf den Laktatgehalt im Medium entsprechend der Stoffwechselsituation wirksam werden lassen (66). Dafür sprächen ebenfalls die Meßdaten der einzelnen Gruppen der hypotherm gelagerten Organe. Analog der längeren Konservierungszeiten wäre ja jeweils ein höherer Schädigungsgrad

der Lebern zu erwarten. Zwar ergaben hier die statistischen Berechnungen nach dem t-Test (Student) keine signifikanten Unterschiede, doch ließ sich deutlich eine steigende Tendenz der Laktatgehalte beobachten. Im Verlauf der Perfusion und der Belastungsinfusion ließen sich zu Versuchsende folgende Steigerungen für die einzelnen Versuchsgruppen gegenüber der Ausgangskonzentration ermitteln:

Gruppe	Laktatkonzentrations- erhöhung 0-105. Min.
I	3,8 %
II a	59,7 %
II b	keine Steigerung (erreicht zu Versuchsende das hohe Ausgangsniveau)
III	21,0 %
IV	44,1 %

Die Einstellung des Mediums auf einen konstanten Laktatspiegel wurde nicht erreicht, konnte aufgrund der Erfahrungen von Schimassek (69) auch nur bei Lebern gefütterter und unbehandelter Tiere erwartet werden. Dennoch zeichnete sich eine klare Tendenz zur Einregulierung der Laktatkonzentration auf ein der Konservierungsdauer und Stoffwechsellage entsprechendes Niveau (besonders Gruppe II) ab, wobei aber keine signifikanten Gruppenunterschiede deutlich wurden. Denn diese interessierten uns in unserer ursprünglichen Fragestellung, ob sich unter Verwendung verschiedener Konservierungsbedingungen während der Perfusionszeit eindeutige Unterschiede erkennen ließen.

5.3. Harnstoff

Eine wichtige Funktion der Leber besteht darin, das im Blut anfallende Ammoniak zu eliminieren und zu Harnstoff umzusetzen. Bei allen Versuchsgruppen zeigte sich, daß diese Syntheseleistung von den isoliert perfundierten Organen erbracht worden ist. Erwartungsgemäß wurde in den ersten 30 Versuchsminuten nur ein minimaler Anstieg der Harnstoffkonzentration im Medium gemessen, da hier außer aus dem geringen endogenen organeigenem Eiweißabbau keine NH_3 -Quelle zur Verfügung stand. Versuch 15 (Abb. 7 und Tab. 5) zeigt die Harnstoffsyntheserate einer isoliert perfundierten Leber ohne exogene Ammoniakzufuhr. Zu Versuchsende (105 Min.) wurde hier eine maximale Konzentration von $2,41 \mu\text{mol/ml}$ erreicht, während sich die Werte in den Versuchen unter Standardbedingungen - Belastung mit NH_4Cl und Ornithin - im Mittel von $5,99$ bis $7,30 \mu\text{mol/ml}$ (Abb. 7 und Tab. 5) bewegten. In allen Versuchsgruppen bewirkte die Zugabe von Ornithin - das nach Untersuchungen von Krebs (15) die Harnstoff-Syntheserate erhöhen soll - und NH_4Cl bis zum Versuchsende eine signifikante ($p < 0,01$) Harnstoff-Konzentrationszunahme im Medium, wie Abb. 7 und Tab. 5 verdeutlichen.

Ein Vergleich der Gruppenmittelwerte untereinander nach dem t-Test (Student) ergab zu den jeweiligen Entnahmezeiten keinerlei Signifikanzen für die unterschiedlichen Konservierungszeiten.

Tab. 5

(Mittelwerte und Standardabweichungen)

Harnstoff / $\mu\text{mol/ml Medium}$	0'	30'	45'	75'	105'
1. ohne Konservierung ($\emptyset$ Lg. 10,6g $\pm$ 1,14 $\pm$)	0,28 $\pm$ 0,19	0,68 $\pm$ 0,50	2,16 $\pm$ 0,52	5,25 $\pm$ 1,54	6,44 $\pm$ 1,96
2. 2 h Konservierung ($\emptyset$ Lg. 10,7g $\pm$ 2,55)	0,38 $\pm$ 0,27	0,66 $\pm$ 0,23	2,41 $\pm$ 1,15	5,07 $\pm$ 1,78	5,99 $\pm$ 1,26
3. 4 h Konservierung ($\emptyset$ Lg. 11,4g $\pm$ 3,15)	0,20 $\pm$ 0,16	0,61 $\pm$ 0,43	2,69 $\pm$ 0,99	5,43 $\pm$ 1,85	7,30 $\pm$ 2,05
4. 8 h Konservierung ($\emptyset$ Lg. 10,2g $\pm$ 1,96)	0,35 $\pm$ 0,15	0,59 $\pm$ 0,20	2,27 $\pm$ 1,14	5,11 $\pm$ 2,50	6,54 $\pm$ 1,84
5. Versuch 15 ohne Konservierung, ohne NH_4Cl -Stoß (9,3 Lg)	0,41	0,70	1,03	1,24	2,41

+) Lg. = Lebergewichte; die Angaben der durchschnittlichen Lebergewichte erfolgten in Gramm.

Tab. 6

Harnstoff / $\mu\text{mol/g Lebergew.}/\text{Min.}$

	0' $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$ 30'	45' $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$ 75'	105' $\leftarrow$ ----- $\rightarrow$ 105'
1. ohne Konservierung	0,11 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,31	0,18 $\pm$ 0,35
2. 2 h Konservierung	0,07 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,44	0,19 $\pm$ 0,08
3. 4 h Konservierung	0,10 $\pm$ 0,11	1,29 $\pm$ 1,18	0,46 $\pm$ 0,28
4. 8 h Konservierung	0,09 $\pm$ 0,10	1,01 $\pm$ 1,05	0,90 $\pm$ 0,80
			0,48 $\pm$ 0,73

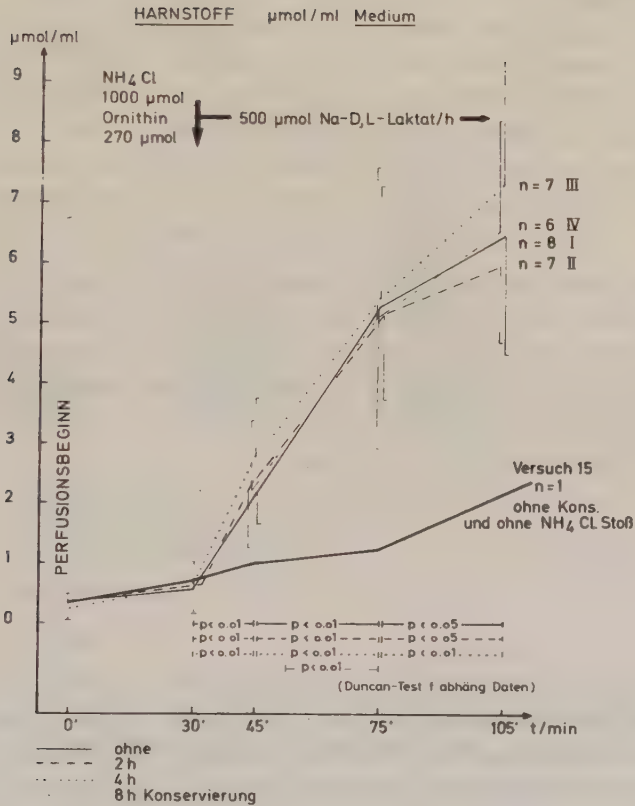


Abb. 7

Da die Harnstoff-Produktion weitgehendst von der Lebergröße abhängig ist (87), wurde zur Feststellung der Leberleistung unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Lebergewichte die Harnstoffsyntheserate in $\Delta \mu\text{mol}$ pro Gramm Lebergewicht und Minute ermittelt.

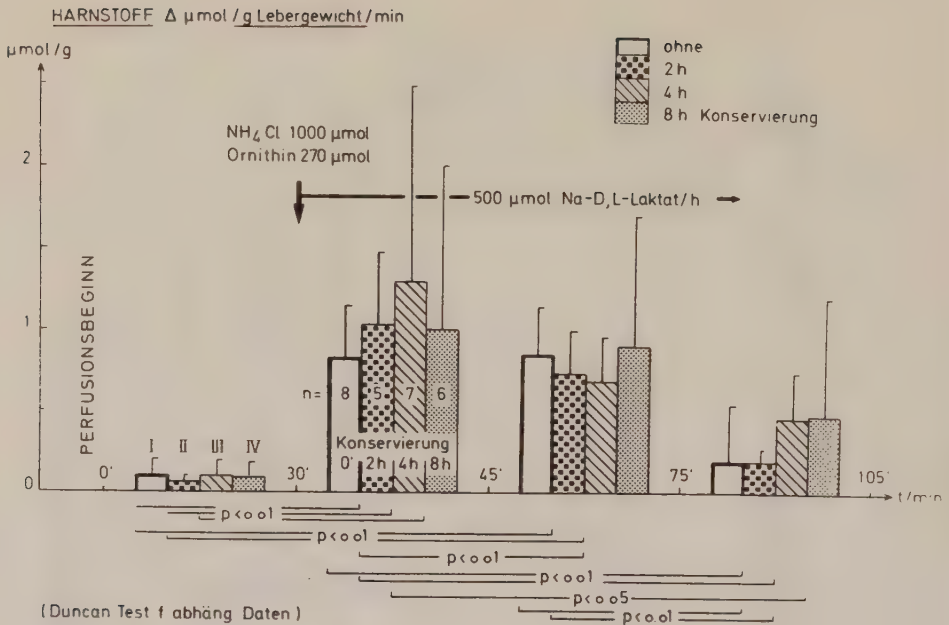


Abb. 8

Die graphische Darstellung Nr. 8 sowie Tab. 6 geben darüber Aufschluß. Entsprechend der im Medium vorhandenen Ammoniakmenge fand die Harnstoff-Produktion statt. Dabei zeigte sich deutlich zu Beginn der Perfusionsversuche (0-30 Min.) eine geringe Syntheserate, die nach der Belastung der Leber signifikant gesteigert ($p < 0,01$) und mit Abnahme des verfügbaren Ammoniaks im III. und IV. Intervall wieder rückläufig wurde. Die Gruppen I bis III zeigten im zweiten Intervall einen signifikanten ($p < 0,01$) Harnstoffanstieg, während für die Gruppe IV infolge der großen Streubreite der Werte keine Signifikanz ermittelt werden konnte. Im weiteren Versuchsverlauf zeigte sich nur für die Gruppen I und II ein signifikanter ($p < 0,01$) Rückgang in der Harnstoffproduktion. Obwohl die mittleren Lebergewichte der

einzelnen Gruppen (I: $10,6 \pm 1,14$; II: $10,7 \pm 2,55$; III: $11,4 \pm 3,15$; IV: $10,2 \pm 1,96$) mit großer Streubreite voneinander differierten, schien die Synthese in den Gruppen I und II schneller abzulaufen als in den länger hypotherm gelagerten Lebern, denen dann im letzten Intervall (75. - 105. Min.) - wohl aufgrund der verzögerten Harnstoffproduktion - noch ein entsprechend größeres Angebot an NH_4 -Ionen zur Verfügung stand. Statistisch ließen sich jedoch aufgrund der Streubreite keine Signifikanzen errechnen.

Nach dem t-Test (Student) ergab der Vergleich der Gruppenmittelwerte zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten untereinander lediglich einen signifikanten Produktionsanstieg zwischen Gruppe I und II auf dem 5 % Niveau in den ersten 15 Minuten nach der Belastung.

5.4. Ketonkörper

- Quotient β -HOB/AC-AC
- AC-AC
- β -HOB

In unseren Versuchsserien stieg der Substratquotient β -HOB/AC-AC erwartungsgemäß analog der längeren hypothermen Lagerung der isoliert perfundierten Lebern. Eindeutig ist aus Abb. 9 und Tab. 7 ersichtlich, daß mit zunehmender Konservierungsdauer die Organ- oder Zellschädigung fortschreitet.

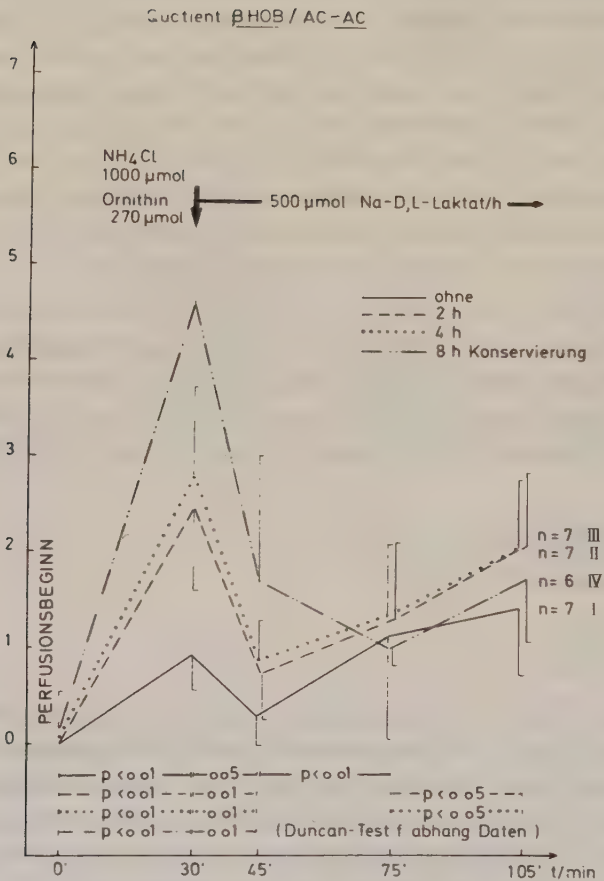


Abb. 9

Tab. 7

(Mittelwerte und Standardabweichungen)

<u>Quotient β-Hydroxybutyrat/Azetazetat</u>		0'	30'	45'	75'	105'
1.	ohne Konservierung	0,00 $\pm$ 0,00	0,91 $\pm$ 0,36	0,29 $\pm$ 0,29	1,23 $\pm$ 1,09	1,44 $\pm$ 0,71
2.	2 h Konservierung	0,00 $\pm$ 0,00	2,44 $\pm$ 0,87	0,73 $\pm$ 0,48	1,30 $\pm$ 0,76	2,06 $\pm$ 0,79
3.	4 h Konservierung	0,00 $\pm$ 0,00	2,75 $\pm$ 0,99	0,87 $\pm$ 0,40	1,35 $\pm$ 0,74	2,05 $\pm$ 0,65
4.	8 h Konservierung	0,17 $\pm$ 0,41	4,62 $\pm$ 2,61	1,69 $\pm$ 1,32	0,99 $\pm$ 0,16	1,68 $\pm$ 0,60

Bis zur 30. Perfusionsminute wies der Gruppenvergleich nach dem t-Test (Student) bereits folgende signifikante Unterschiede auf:

zwischen Gruppe I und II ($p < 0,01$)

I und III ($p < 0,01$)

I und IV ($p < 0,05$)⁺

(⁺ Die Signifikanz auf dem 5 % Niveau wurde durch die große Streubreite der Werte in Gruppe IV bedingt).

Nach der Belastung der Leber - mit NH_4Cl , Ornithin und Laktatinfusion - sank die β -HOB-Konzentration im Medium erheblich ab, während der AC-AC-Spiegel sich leicht erhöhte. (Abb. 10 und 11, Tab. 8 und 9). Auch im Quotienten fand der β -HOB-Abfall einen starken Niederschlag (30-45. Min.) (Abb. 9, Tab. 7).

Wie Einzelversuche ergaben (Abb. 12 und Tab. 10 und 11), konnte die Konzentrationsabnahme von β -HOB auf die Stoßgabe von NH_4Cl zurückgeführt werden (Versuch 15).

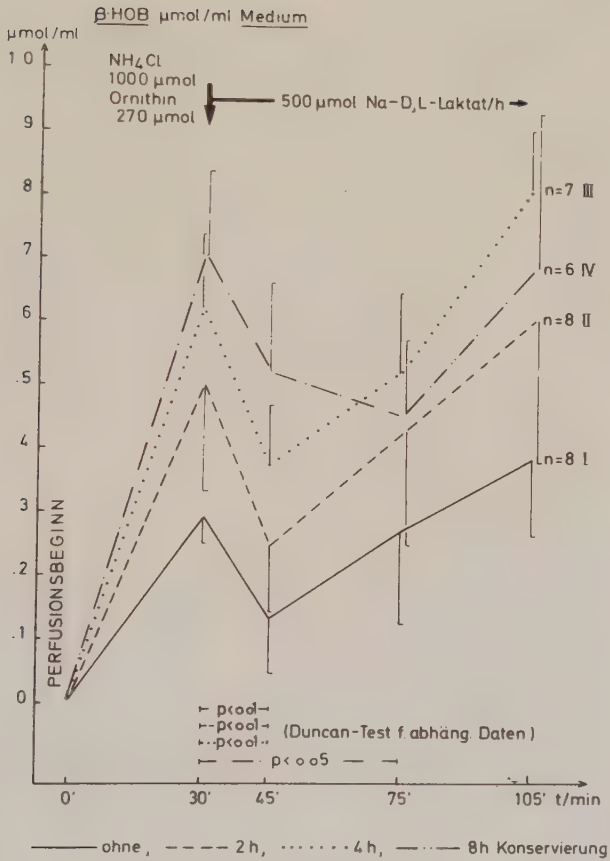


Abb. 10

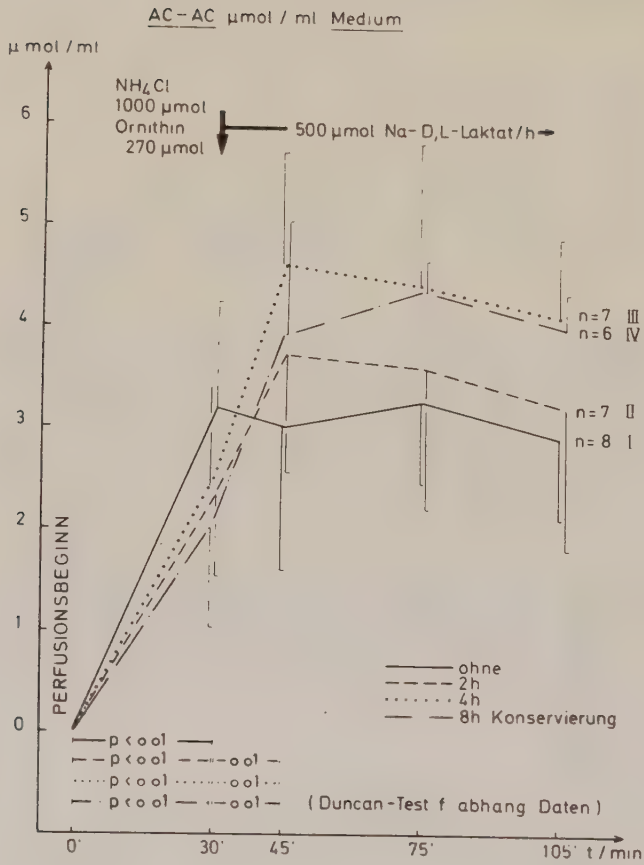


Abb. 11

Tab. 8

β -Hydroxybutyrat / $\mu\text{mol/ml}$ Medium	0'	30'	45'	75'	105'
1. ohne Konservierung	$0,01 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,09$	$0,27 \pm 0,15$	$0,39 \pm 0,12$
2. 2 h Konservierung	$0,00 \pm 0,00$	$0,50 \pm 0,17$	$0,25 \pm 0,11$	$0,42 \pm 0,17$	$0,61 \pm 0,23$
3. 4 h Konservierung	$0,00 \pm 0,00$	$0,62 \pm 0,12$	$0,38 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,12$	$0,81 \pm 0,09$
4. 8 h Konservierung	$0,00 \pm 0,01$	$0,70 \pm 0,13$	$0,52 \pm 0,14$	$0,45 \pm 0,14$	$0,68 \pm 0,25$

Tab. 9

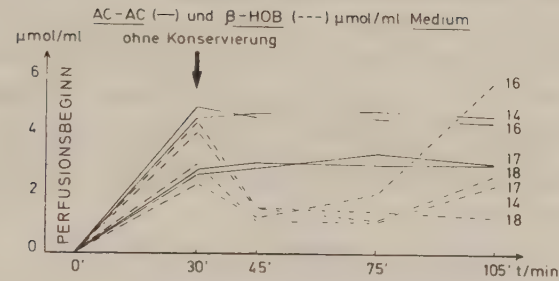
Azetazetat / $\mu\text{mol/ml}$ Medium	0,00 $\pm$ 0,00	0,32 $\pm$ 0,11	0,30 $\pm$ 0,14	0,33 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,08
1. ohne Konservierung					
2. 2 h Konservierung	$0,00 \pm 0,00$	$0,23 \pm 0,07$	$0,37 \pm 0,13$	$0,36 \pm 0,14$	$0,32 \pm 0,14$
3. 4 h Konservierung	$0,00 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,11$	$0,45 \pm 0,14$	$0,41 \pm 0,07$
4. 8 h Konservierung	$0,00 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,11$	$0,39 \pm 0,11$	$0,43 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,03$

Tab. 10

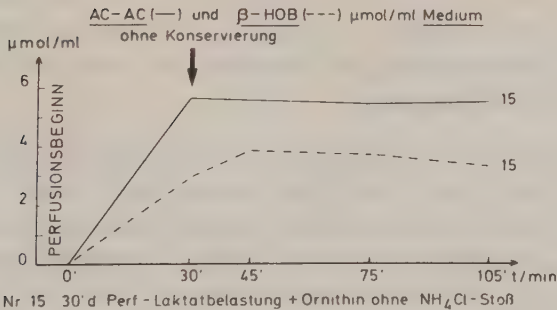
Azetazetat / μ mol/ml Medium	0'	30'	45'	75'	105'
(ohne Konservierung)					
Versuch Nr.: 14	0,00	0,47	0,49	0,49	0,48
15	0,01	0,56	0,55	0,55	0,55
16	0,00	0,50	0,47	0,47	0,46
17	0,00	0,28	0,30	0,35	0,32
18	0,00	0,29	0,32	0,31	0,31

Tab. 11

β -Hydroxybutyrat / μ mol/ml Medium					
(ohne Konservierung)					
Versuch Nr.: 14	0,00	0,43	0,16	0,12	0,24
15	0,00	0,29	0,39	0,37	0,34
16	0,01	0,24	0,13	0,21	0,60
17	0,00	0,31	0,12	0,13	0,29
18	0,00	0,46	0,16	0,15	0,13



- Nr 14. n 30 min Perf NH_4Cl -Stoß + Ornithin ohne Laktat
 Nr 16. " NH_4Cl -Stoß + Laktatbelastung ohne Ornithin
 Nr 17. " NH_4Cl -Stoß + Ornithin
 + 1000 $\mu\text{mol/h}$ NH_4Cl -Infusion
 + Laktatbelastung
 Nr 18. " NH_4Cl -Stoß + Ornithin
 + 1000 $\mu\text{mol/h}$ NH_4Cl -Infusion ohne Laktat



Nr 15 30'd Perf - Laktatbelastung + Ornithin ohne NH_4Cl -Stoß

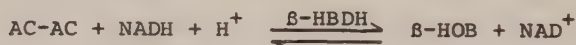
Abb. 12

Bekannterweise kann die Verwertung des Ammoniaks im Medium mehrere Wege beschreiten. Einmal findet es direkte Verwendung zur Harnstoffbiosynthese. Zum anderen bietet sich eine zweite Möglichkeit durch die Übertragung des Ammoniaks auf die α -Ketoglutar-säure und es kommt zur Bildung der Glutaminsäure. Da diese Reaktion aber durch die NAD-abhängige L-Glutaminsäure-Dehydrogenase (G1DH) katalysiert wird,

ist sie gewissermaßen die Rückreaktion der oxydativen Desaminierung. Dabei kommt es aber unter der Leberbelastung zur Oxydation des NADH zu NAD^+ :



Dieser Überschuß des NAD^+ führt zur Oxydation des β -HOB und einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten von AC-AC:



Da die Reaktionen beider Mitochondrienenzyme - GLDH und β -HBDH - über den gleichen NAD/NADH-Pool ablaufen (101), kann der Konzentrationsabfall von β -HBT im Medium durch die erhöhte Glutamatbildung und Harnstoffproduktion (Gruppen I, II, III, IV) ($p < 0,01$) Abb. 7 sowie einem signifikanten Ansteigen des AC-AC-Gehaltes (Gruppen II, III, IV) ($p < 0,01$) Abb. 11 (30-45 Min.) seine Erklärung finden. Erst nach Absinken des Ammoniak-Spiegels konnte wieder ein Zunehmen der β -HOB-Konzentration beobachtet werden.

Während sich in den Gruppen I bis III bereits nach 15 Min. wieder eine steigende Tendenz des β -HOB-Gehaltes abzeichnete, verlief für die Gruppe IV die Konzentrationsabnahme weniger steil, erstreckte sich aber auf eine Zeitspanne von 45 Minuten (30.-75. Min.) (Abb. 10). Vermutlich hatten die Lebern dieser Gruppe bereits einen höheren aber reversibleren Schädigungsgrad erreicht, so daß nur noch eine verzögerte Metabolisation möglich war.

Im weiteren Versuchsverlauf - 30. bis 105. Minute - ergab ein Vergleich nach dem t-Test (Student) für den β -HOB/AC-AC-Quotienten lediglich einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe I und III ($p < 0,01$) zum Zeitpunkt von 45 Min.

Aufgrund dieses Parameters werden die deutlichen Unterschiede aufgezeigt, daß jede Organkonservierung zu einer der hypothermen Lagerungsdauer entsprechenden Funktionseinbuße führt, mit der Einschränkung , daß erst nach erfolgter Transplantation, Revaskulasierung und Wiederaufnahme der Organfunktion beurteilbar ist, inwieweit es sich dabei um tatsächlich reversible oder irreversible Zell- und Organschädigungen handelte.

VI. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber im rezirkulierenden System nach Miller (53) und Schimassek (67) leberspezifische Funktionsleistungen auf ihre Bedeutung als Parameter für die Funktionsintegrität unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Konservierungszeiten (0, 2, 4, 8 Std.) überprüft.

Wenn auch Vitalität und Funktionsintegrität der transplantierten Leber endgültig nach erfolgter Implantation im Empfängerorganismus, Revaskularisation und Wiederaufnahme ihrer Funktionen beurteilbar sein wird (12, 96), so gilt es dennoch als erstrebenswert, funktionelle irreversible Organ- oder Zellschädigungen möglichst unmittelbar im Anschluß an die Konservierungsphase aufzudecken.

Unter diesem Gesichtspunkt erschienen uns zwei große Gruppen der Stoffwechselvorgänge als geeignet, diejenigen, die sich im Cytoplasma der Leberzellen abspielen wie Gluconeogenese und Glykolyse, sowie jene, die in den feineren Kompartimenten, den Mitochondrien, der Leberzellen - Harnstoffsynthese und Ketonkörperproduktion - lokalisiert sind.

Aus Untersuchungen von Rokà und Miertsch (52) ist bekannt, daß die intakte isoliert perfundierte Rattenleber ohne präoperative Nahrungskarenz im rezirkulierenden System mit einem Medium ohne glukoplastische Substanzen (Krebs-Henseleit-Puffer, Tab. 1, S.9) perfundiert, in der Lage ist, nach ca. 45 Versuchsminuten den Blutzuckerspiegel im Medium auf ein konstantes Niveau von $110 \text{ mg/\%} = 5,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ einzuregulieren. Schwach oder stark vorgeschädigte Lebern konnten die Glukosekonzentration im Perfusat nicht mehr konstant halten; entweder nahm sie kontinuierlich während der Perfusion ab oder pendelte um den mit dem Ausgangsmedium zugeführten Glukosegehalt (52).

In unseren Perfusionsversuchen mit der Albumin-Tyrode-Lösung und überalterten Humanerythrocyten als Sauerstoffträger konnten wir bereits während der ersten 30 Versuchsminuten eine signifikante Glukosesteigerung im Medium (Gruppe I-III $p < 0,01$; IV $p < 0,05$) beobachten und erreichten zum genannten Abnahmezeitpunkt einen Gesamtdurchschnittswert aller Meßdaten von $108 \text{ mg/\%} = 5,42 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ (Abb. 4, Tab. 2). Aus diesen Meßwerten ist eindeutig zu erkennen, daß die Funktionsfähigkeit der isoliert perfundierten Leber insoweit vorhanden ist, daß die Organe Bestrebungen zeigen, den Blutzuckergehalt im Medium auf einen Wert einzustellen, den andere Autoren (52) bei unvorbehandelten Lebern ebenfalls fanden. Während es sich bei den Untersuchungen von Rokà und Miertsch wahrscheinlich um die Mobilisation von Glykogenreserven der Lebern handelte, können wir aufgrund der 24-stündigen präoperativen Nahrungskarenz unserer Versuchstiere sowie Versuche von Förster et al. (21) - daß bereits nach 12-stündiger Nahrungskarenz die Lebern praktisch glykogenfrei seien - annehmen, daß es sich hier nicht um eine Mobilisation möglichen Restglykogens handelte, sondern um eine echte gluconeogenetische Funktionsleistung der isolierten Lebern. Der weitere Versuchsverlauf erhärtete unsere Annahme. Die Gruppen I und II zeigten unter der Laktatbelastung in Form einer Dauerinfusion von $500 \text{ } \mu\text{mol/h}$ einen kontinuierlichen Glukoseanstieg im Medium, wie es auch Krebs (29) unter gleichen Versuchsbedingungen ermitteln konnte; in den Gruppen III und IV wurden zu Versuchsende (105 Min.) Glukosekonzentrationsspiegel in der gleichen Größenordnung wie in den Gruppen I und II erreicht. Die zwischenzeitliche Glukoseabnahme im Medium (Gruppe III bei 75 Min., IV bei 45 Min.), die voll kompensiert wurde, war wohl Ausdruck eines vorübergehend erhöhten Energiebedarfs der Lebern, den sie zu decken nur mit Hilfe des exogenen Glukoseangebotes imstande waren (Abb. 4, Tab. 2).

Wie auch Schimassek (68) konnten wir in den Versuchsserien keine Einstellung eines konstanten Niveaus des Blutzuckerspiegels im Medium beobachten. Die weitere Glukoseabgabe an das Medium unter der Laktatdauerinfusion liegt bei "in-vitro-Versuchen" mit Lebern einer 24-stündigen Nahrungskarenz wohl darin begründet, daß zur Umsetzung der Glukose zu Glykogen das notwendige Glykogen- oder Dextrin-Startmolekül fehlte (72, 37). Da von uns jedoch keine Glykogenbestimmungen durchgeführt wurden, wird die Bestätigung dieser Vermutung Gegenstand weiterer Untersuchungen bilden.

Da sich keine statistischen signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten untereinander ermitteln ließen, können wir davon ausgehen, daß es sich bei allen unseren Versuchshebern um weitgehendst gleichwertige funktionstüchtige Organe - auch nach der Konservierungsphase - handelte.

Aufgrund der - aus vorstehend genannten Gründen (S.10) - nicht mit in die Arbeit aufgenommenen Pyruvatwerte bieten die Laktatkonzentrationen im Medium nur eine geringe Aussagekraft; denn Schimassek (68) ermittelte, daß die absoluten Meßdaten sowohl von Pyruvat als auch von Laktat allein nur wenig über den tatsächlichen Funktionszustand der isolierten Leber aussagen können, sondern allein der Quotient beider Substrate, da sie in einem dynamischen Gleichgewicht stehen, dafür erforderlich sei. Hohorst (35) und Schimassek (68) fanden anhand zahlreicher Untersuchungen, daß der L/P-Quotient ein Indikator für den Redoxzustand des extramitochondrialen NAD/NADH-Systems sei.

Obwohl wir die Einregulierung eines Laktatspiegels auf ein konstantes Niveau nur bei der Perfusion gefütterter und unvorbehandelter Versuchstiere erwarten konnten (69), prüften wir dennoch das Verhalten der Laktatkonzentration im Medium unter der Milchsäurebelastung (500 $\mu\text{mol/h}$ als Dauerinfusion) in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Konservierungszeiten. Statistisch ließen sich

für die verschiedenen lang konservierten Organgruppen untereinander keine Signifikanzen (t-Test nach Student) ermitteln. Auffallend war jedoch, daß trotzdem eine Tendenz der Lebern bestehen muß, entsprechend der Stoffwechselsituation der isolierten Organe einen Kontroll- oder Regelmechanismus auf den Laktatspiegel im Medium wirksam werden zu lassen (66). Unabhängig von den Ausgangskonzentrationen im Medium (68) konnten wir in Gruppe II (a. $2,26 \pm 0,21$; b. $3,69 \pm 0,31$ Laktatausgangskonzentration) beobachten, daß sich die Kurvenverläufe von II a und II b (Abb. 6 und 6 a, Tab. 4) der einheitlich zwei Stunden konservierten Lebern einander näherten und ab der 63. Versuchsminute bis zum Perfusionsende (105 Min.) einen fast identischen Verlauf nahmen. Daraus kann resultieren, daß die Konservierungsdauer der isolierten Organe mit ein entscheidender Faktor für die Stoffwechsellage ist.

Zahlreiche Untersuchungen verdeutlichen, daß die Elimination von NH_3 und dessen Umsetzung zu Harnstoff in der Leber äußerst resistente Funktionsabläufe bei Leberschädigungen darstellen (87, 110, 111). Eiseman et al. (110) haben an Kadaverlebern nach sechsständiger Warmischämie zeigen können, daß sich ihre Harnstoffsynthese von den frisch exzidierten nicht signifikant unterschied. Ebenso konnte er sogar an Leberschnitten und Leberzellsuspensionen noch eine geringe Harnstoffproduktion messen (84).

Wenn diese Versuchsergebnisse auch zu einer Einschränkung der Aussagekraft für die Vitalität und Funktionsintegrität der isolierten Organe führen, liegt die große Bedeutung dieser partiellen Leberfunktionsprüfung darin, daß bei ihrer deutlichen Einschränkung oder Aufhebung mit Sicherheit ein irreversibler Organschaden angenommen werden kann, der unter den Bedingungen einer Lebertransplantation den operativen Eingriff als aussichtslos erscheinen lassen.

Unter der Belastung mit einer Stoßgabe von 1000 μmol NH_4Cl kam es bei allen Versuchsgruppen zu einer signifikant ($p < 0,01$) gesteigerten Harnstoffsynthese. Es wurden Mittelwerte von 5,99 bis 7,30 $\mu\text{mol/ml}$ im Gegensatz zur Syntheserate von 2,41 $\mu\text{mol/ml}$ im Versuch 15, dem kein exogenes Ammoniak zugeführt wurde (Abb. 7 und Tab. 5), erzielt.

Unter Berücksichtigung der Einwände von Eiseman und Wyk (110, 111), die Harnstoffproduktion als Parameter zur Funktionsintegrität der isolierten Lebern heranzuziehen, ist dem Befund, daß bei unserer Versuchsanordnung in jeder Versuchsgruppe die isoliert perfundierten Lebern über die gesamte Perfusionsdauer zur Harnstoffsynthese im Stande waren, eine funktionelle Bedeutung beizumessen. Die Beobachtung, daß sich die Harnstoffproduktion der nicht konservierten Lebern mit denjenigen der Gruppe IV (8 h Konservierungszeit) identisch verhielten, muß eindeutig die Aussagen von Wyk, Eiseman (110, 111) und Waldschmidt et al. (87) unterstreichen, daß erst ein extremer Schädigungsgrad des Organs zur Funktionsbeeinträchtigung führt; somit gilt die Harnstoffsynthese innerhalb der Funktionsparameter als nicht sensibler Indikator für das Organ- oder Zellschädigungsmaß.

Signifikante Unterschiede nach dem t-Test (Student) bei den Gruppenmittelwerten untereinander zu den jeweiligen Entnahmezeiten ließen sich auch hier erwartungsgemäß nicht ermitteln.

Als weitere Parameter haben wir die Ketonkörper β -HOB und AC-AC im Medium gemessen. Durch die teilweise Reduktion der Acetessigsäure durch das sessile Mitochondrienenzym β -HBDH und dem Coenzym NADH_2 liegen beide Substrate als ein im Gleichgewicht stehendes Gemisch vor. Der β -HOB/AC-AC-Quotient gilt nach Krebs et al. (41, 101, 81) als Indikator für das mitochondriale Redox-System NAD/NADH und als geeigneter

Parameter zur Beurteilung isolierter Organe; bereits geringe Zell- oder Gewebsschädigungen führen zur Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten des β -HOB-Spiegels. Der Quotient aus β -HOB und AC-AC zeigte analog der verschiedenen Konservierungszeiten bis zur 30. Perfusionsminute signifikant höhere Werte im Gruppenvergleich (t-Test nach Student)

I zu II, III $p < 0,01$

I zu IV $p < 0,05$ (aufgrund der großen Streubreite)

Es schien sich hier jeweils um reversible Organbeeinträchtigungen zu handeln, da die Kurvenverläufe im weiteren Versuchsablauf sich einander näherten und keine Signifikanzen aufwiesen.

Nach der Stoßgabe von NH_4Cl konnte in allen Versuchsgruppen für β -HOB ein signifikanter Abfall (I-III $p < 0,01$; IV $p < 0,05$) sowie ein signifikanter Anstieg für AC-AC in den Gruppen II-IV ($p < 0,01$) im Medium beobachtet werden. Hieraus resultierend zeigten sich auch signifikante Abfälle im Substratquotienten (I: $p < 0,05$; II-IV: $p < 0,01$; Abb. 9 und Tab. 7).

Wie Einzelversuche bestätigten (Abb. 12, 13; Tab. 11, 12) konnten die Konzentrationsabnahmen von β -HOB auf den NH_4Cl -Stoß nach der 30. Perfusionsminute zurückgeführt werden (Versuch 15).

Die Bindung des Ammoniaks kann auf zwei Wegen erfolgen: a) direkt zur Harnstoffsynthese und b) durch die Übertragung auf die α -Ketoglutarensäure, die zur Bildung der Glutaminsäure führt. Zur Katalysierung dieser Reaktion bedarf es aber der NAD-abhängigen 2-Glutaminsäure-Dehydrogenase und stellt gewissermaßen die Rückreaktion der oxydativen Desaminierung dar und unter der Leberbelastung mit NH_4Cl kommt es zur Oxydation des NADH zu NAD^+ ; dieser Überschuß an NAD^+ zieht die Oxydation des β -HOB und eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten von AC-AC nach sich. Entscheidend

ist dabei jedoch, daß die Reaktionen beider Mitochondrienenzyme G1DH und β -HBDH über den gleichen NAD/NADH-Pool (101, 81) ablaufen. Erst nach Absinken des Ammoniakspiegels aufgrund der Glutamatbildung und Harnstoffproduktion konnte wieder ein Zunehmen der β -HOB-Konzentration in allen Gruppen beobachtet werden. Unter dem Gesichtspunkt der ausgewählten Parameter zur Beurteilung der Funktionsintegrität der isolierten Lebern unmittelbar nach der Konservierungsphase schien der Quotient aus β -HOB/AC-AC aufgrund unserer Versuche ein wesentlich sensiblerer Indikator für den durch die jeweilige Konservierungsdauer bedingten Schädigungsgrad - reversibler oder irreversibler Art zu sein.

Im Hinblick auf die eingangs gestellte Aufgabe dieser Arbeit, funktionelle Kriterien zur Güte der Organfunktion eines möglichen Transplantats aufzuzeigen, muß gesagt werden, daß sowohl das Verhalten der Glukosekonzentration wie auch der Harnstoffsyntheserate keine Anhaltspunkte zur Organschädigung für die unterschiedlich lang hypotherm gelagerten Lebern aufwies, das Verhalten des Laktatspiegels bereits eine Tendenz zur Klassifizierung der Stoffwechsellage entsprechend der Konservierungsdauer der einzelnen Gruppen zeigte. Durch die Bestimmung der Ketonkörper β -HOB sowie AC-AC und dem Quotienten aus beiden Substraten scheint jedoch eine Aussage und Abstufung über das Ausmaß der in unseren Versuchsserien wohl reversiblen Beeinträchtigungen der Leberfunktionen in Abhängigkeit von der hypothermen Lagerung wesentlich besser zu erreichen zu sein.

Die Darstellung der einzelnen Funktionsparameter sollten lediglich dazu dienen, eventuell während der Operations- oder Konservierungsphase entstandenen irreversiblen Zell- oder Organschädigungen möglichst frühzeitig, d.h. vor der Transplantation, aufzudecken.

Vervollständigt werden könnten diese biochemischen Teilaspekte nur durch die Transplantation dieser Lebern nach den jeweiligen Konservierungszeiten und die sich dann ergebende Korrelation zwischen Funktionswiederaufnahme des Transplantats und der während der Konservierungsphase bestimmten biochemischen Einzelparameter.

VII. Zusammenfassung

Am Modell der isoliert perfundierten Rattenlebern im rezirkulierenden System wurden leberspezifische Funktionsleistungen auf ihre Bedeutung als Parameter für die Funktionsintegrität und Vitalität eines möglichen Transplantats unter Berücksichtigung der verschieden langen Konservierungsphase geprüft. Obwohl als Hauptkriterium zur funktionellen Integrität eines Transplantats allein die Wiederaufnahme der Funktionsleistungen der Leber nach erfolgter Implantation im Empfängerorganismus gilt, schienen uns Parameter der Stoffwechselvorgänge wie Gluconeogenese und Glykolyse, Harnstoffsynthese und Ketonkörperproduktion geeignet, mögliche funktionelle Beeinträchtigungen des Lebertransplantats während oder unmittelbar im Anschluß an die Konservierungsphase aufzuzeigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß sowohl die Meßdaten der Glukosebestimmungen als auch die der Harnstoffsynthese keinen Anhalt für eine Organschädigung der jeweiligen isolierten Rattenlebern boten. Die ermittelten Mittelwerte der unterschiedlich lang konservierten Lebern wiesen in allen Gruppen Funktionsleistungen wie Gluconeogenese und Harnstoffsynthese aus, die sich jedoch nicht signifikant analog der längeren hypothermen Lagerung voneinander unterschieden (Abb. 4, 7; Tab. 2, 5).

Dagegen zeigte das Verhalten des Laktatspiegels im Medium eine Tendenz zur Abstufung der Stoffwechsellage entsprechend der jeweiligen längeren Konservierungszeit (Abb. 6, 6a; Tab. 4); in den Kurvenverläufen der Gruppe der 2-stündig hypotherm gelagerten Lebern kam es trotz der unterschiedlichen Laktatausgangsmenge im Medium ab der 63. Versuchsminute zu einem fast identischen Verlauf.

Durch die Bestimmungen der Ketonkörper β -HOB sowie AC-AC und dem Quotienten aus beiden Substraten zeichnete sich eine wesentlich klarere Abstufung über das Ausmaß der in unseren Versuchsserien wohl reversiblen Beeinträchtigungen der Leberfunktionen in Abhängigkeit von der hypothermen Lagerung ab (Abb. 9, 10, 11; Tab. 7, 8, 9). Aufgrund dieses sensiblen Parameters wurden durch deutliche Unterschiede aufgezeigt, daß Funktionseinbußen reversibler oder irreversibler Art eines Organs jeweils mit der Länge der Konservierungsphase korrelieren, allerdings mit der Einschränkung, daß die biochemischen Parameter nur einen Anhalt zur funktionellen Güte des Transplantats ermöglichen; daß reversible oder irreversible Schädigungen sowie Funktionsintegrität jedoch erst nach erfolgter Implantation, Revaskularisierung und Funktionswiederaufnahme im Empfängerorganismus endgültig beurteilbar sind.

VIII. Tabellenanhang

Meßergebnisse der einzelnen Versuche: M = Mittelwert der Meßergebnisse; S = Standardabweichung

Tab. I: Glukose / μ mol/ml Medium

	0	30	45	75	105 Min.
<u>ohne Konserv.</u>	3,61	4,44	5,05	6,06	9,50
	3,44	5,00	4,77	5,33	5,61
	3,55	5,77	6,50	6,77	8,66
	2,61	4,88	4,88	6,22	6,55
	2,50	4,05	4,16	3,66	5,50
	4,15	7,95	7,86	8,05	8,52
	3,27	5,32	5,08	5,32	6,53
M	3,30	5,34	5,47	5,91	7,27
S $\pm$	0,58	$\pm$ 1,28	$\pm$ 1,27	$\pm$ 1,36	$\pm$ 1,60
<u>2 Std. Konserv.</u>	3,30	3,90	3,73	4,33	5,91
	3,79	6,75	8,84	9,21	8,65
	3,71	5,61	5,72	6,25	5,66
	3,55	6,32	4,93	5,13	5,18
	3,64	4,87	6,48	6,54	9,00
	4,83	5,60	6,45	6,71	6,97
	4,96	5,76	6,07	5,81	7,49
M	3,97	5,54	6,03	6,28	6,98
S $\pm$	0,65	$\pm$ 0,94	$\pm$ 1,57	$\pm$ 1,54	$\pm$ 1,49
<u>4 Std. Konserv.</u>	4,62	6,05	6,50	6,72	7,82
	3,78	4,68	6,12	5,57	7,33
	3,85	4,43	5,05	4,61	5,34
	3,64	4,25	4,32	5,30	5,36
	4,16	6,49	5,86	5,86	7,41
	3,21	4,95	5,02	3,92	7,43
	3,20	4,79	5,14	4,13	5,14
M	3,78	5,09	5,43	5,16	6,55
S $\pm$	0,51	$\pm$ 0,85	$\pm$ 0,76	$\pm$ 1,00	$\pm$ 1,20

Glukose $\mu\text{mol/ml}$ Medium

	0	30	45	75	105 Min.
<u>8 Std. Konserv.</u>	4,04	4,94	4,16	4,47	4,90
	4,52	8,13	6,63	8,00	10,84
	4,54	6,19	7,20	8,03	7,69
	3,69	4,57	4,39	4,65	5,86
	3,66	6,07	5,03	7,61	8,65
	3,84	3,82	4,47	4,76	2,54
M	4,05	5,62	5,31	6,25	6,75
S $\pm$	0,40	$\pm$ 1,52	$\pm$ 1,28	$\pm$ 1,79	$\pm$ 2,94

Tab. II: Laktat $\mu\text{mol/ml}$ Medium

<u>ohne Konserv.</u>	1,49	0,41	1,05	2,63	2,77
	1,97	1,02	1,23	1,85	2,83
	1,63	0,34	1,09	1,59	1,41
	2,08	0,37	1,01	2,14	2,25
	2,94	0,38	1,02	1,31	1,85
	1,96	0,35	0,97	1,23	1,70
	2,17	0,29	0,81	1,59	1,93
M	2,03	0,45	1,02	1,76	2,10
S $\pm$	0,47	$\pm$ 0,25	$\pm$ 0,13	$\pm$ 0,49	$\pm$ 0,54
<u>2 Std. Konserv. A:</u>	2,38	1,96	1,75	1,68	1,88
	2,02	0,93	1,19	1,66	2,35
	2,38	3,27	4,18	5,78	6,61
M	2,26	2,05	2,37	3,04	3,61
S $\pm$	0,21	$\pm$ 1,17	$\pm$ 1,59	$\pm$ 2,37	$\pm$ 2,60
<u>B:</u>	3,22	2,37	1,90	2,31	2,65
	3,83	2,00	1,64	1,97	2,09
	3,88	3,90	3,81	3,88	5,34
	3,83	3,49	3,41	3,25	4,66
M	3,69	2,94	2,69	2,85	3,68
S $\pm$	0,31	$\pm$ 0,90	$\pm$ 1,08	$\pm$ 0,87	$\pm$ 1,56
<u>A + B:</u> M	3,08	2,56	2,55	2,93	3,65
S $\pm$	0,80	$\pm$ 1,04	$\pm$ 1,20	$\pm$ 1,51	$\pm$ 1,87

A = normale Laktatausgangsmenge

B = doppelte Laktatausgangsmenge

Laktat ,umol/ml Medium

	0	30	45	75	105 Min.
<u>4 Std. Konserv.</u>	4,97	4,58	3,57	4,35	5,33
	3,03	2,47	1,99	3,08	3,60
	2,75	2,92	3,58	5,32	6,18
	5,03	3,07	1,55	1,52	1,72
	4,06	3,48	3,26	3,35	4,79
	4,33	3,59	2,86	5,08	6,01
	3,81	3,78	4,52	5,13	6,27
M	4,00	3,41	3,05	3,97	4,84
S $\pm$	0,88	$\pm$ 0,68	$\pm$ 1,01	$\pm$ 1,40	$\pm$ 1,67
<u>8 Std. Konserv.</u>	3,86	3,86	2,45	3,17	4,33
	3,14	3,34	2,82	5,20	5,32
	3,92	3,77	2,72	5,49	6,50
	4,13	3,76	2,76	4,76	6,98
	3,97	3,53	3,78	4,42	5,96
	3,40	1,81	2,08	2,20	3,24
M	3,74	3,34	2,77	4,21	5,39
S $\pm$	0,38	$\pm$ 0,77	$\pm$ 0,57	$\pm$ 1,27	$\pm$ 1,40

Tab. III: Harnstoff ,umol/ml Medium

<u>ohne Konserv.</u>	0,41	0,00	1,65	4,38	5,58
	0,00	0,21	3,21	6,99	6,99
	0,38	0,96	1,78	5,24	6,23
	0,04	1,56	2,69	8,13	10,83
	0,11	0,68	1,79	5,08	5,82
	0,48	0,85	2,23	4,48	6,36
	0,40	0,33	1,79	3,80	5,71
	0,43	0,88	2,27	3,94	4,04
M	0,28	0,68	2,16	5,25	6,44
S $\pm$	0,19	$\pm$ 0,50	$\pm$ 0,52	$\pm$ 1,54	$\pm$ 1,96

Harnstoff $\mu\text{mol/ml}$ Medium

	0	30	45	75	105 Min.
<u>2 Std. Konserv.</u>	0,56	0,56	0,84	2,00	3,90
	0,56	0,67	3,03	5,52	6,48
	0,42	0,74	2,88	5,78	5,80
	0,38	0,70	0,77	3,31	4,92
	0,65	0,79	3,73	6,91	7,51
	0,00	0,21	2,53	6,62	7,20
	0,12	0,93	3,09	5,39	6,15
M	0,38	0,66	2,41	5,07	5,99
S $\pm$	0,27	$\pm$ 0,23	$\pm$ 1,15	$\pm$ 1,78	$\pm$ 1,26
<u>4 Std. Konserv.</u>	0,25	0,83	2,97	6,34	8,11
	0,45	0,98	2,88	6,17	10,04
	0,30	0,23	1,25	2,12	4,16
	0,00	1,18	3,23	7,50	9,03
	0,23	0,68	2,30	6,04	7,34
	0,16	0,36	1,91	3,70	5,23
	0,00	0,00	4,31	6,15	7,19
M	0,20	0,61	2,69	5,43	7,30
S $\pm$	0,16	$\pm$ 0,43	$\pm$ 0,99	$\pm$ 1,85	$\pm$ 2,05
<u>8 Std. Konserv.</u>	0,38	0,55	0,83	2,67	4,41
	0,49	0,46	1,18	2,22	4,68
	0,34	0,54	2,62	6,50	9,52
	0,44	0,95	3,03	6,50	6,63
	0,38	0,38	3,85	4,19	7,31
	0,07	0,63	2,13	8,60	6,68
M	0,35	0,59	2,27	5,11	6,54
S $\pm$	0,15	$\pm$ 0,20	$\pm$ 1,14	$\pm$ 2,50	$\pm$ 1,87

Tab. IV: β -HOB μ mol/ml Medium

	0	30	45	75	105 Min.
<u>ohne Konserv.</u>	0,00	0,33	0,24	0,35	0,36
	0,00	0,35	0,22	0,27	0,36
	0,03	0,30	0,10	0,44	0,42
	0,03	0,34	0,15	0,49	0,58
	0,05	0,29	0,21	0,28	0,41
	0,00	0,23	0,03	0,13	0,30
	0,01	0,24	0,11	0,12	0,49
	0,00	0,27	0,01	0,10	0,17
M	0,01	0,29	0,13	0,27	0,39
S $\pm$	$\pm$ 0,02	$\pm$ 0,04	$\pm$ 0,09	$\pm$ 0,15	$\pm$ 0,12
<u>2 Std. Konserv.</u>	0,01	0,25	0,34	0,52	0,47
	0,00	0,54	0,25	0,64	0,79
	0,00	0,33	0,10	0,41	0,39
	0,00	0,45	0,35	0,30	0,27
	0,00	0,66	0,15	0,39	0,86
	0,00	0,42	0,11	0,09	0,49
	0,00	0,68	0,37	0,45	0,82
	0,00	0,71	0,32	0,58	0,78
M	0,00	0,50	0,25	0,42	0,61
S $\pm$	$\pm$ 0,00	$\pm$ 0,17	$\pm$ 0,11	$\pm$ 0,17	$\pm$ 0,23
<u>4 Std. Konserv.</u>	0,00	0,70	0,35	0,33	0,86
	0,00	0,67	0,29	0,42	0,77
	0,00	0,66	0,46	0,72	0,94
	0,00	0,40	0,47	0,57	0,76
	0,00	0,53	0,23	0,57	0,89
	0,01	0,77	0,40	0,50	0,78
	0,00	0,60	0,44	0,55	0,68
M	0,00	0,62	0,38	0,52	0,81
S $\pm$	$\pm$ 0,00	$\pm$ 0,12	$\pm$ 0,09	$\pm$ 0,12	$\pm$ 0,09

β -HOB μ mol/ml Medium

	0	30	45	75	105 Min.
<u>8 Std. Konserv.</u>	0,00	0,85	0,56	0,33	0,40
	0,02	0,47	0,70	0,38	0,39
	0,00	0,66	0,50	0,40	0,71
	0,01	0,81	0,53	0,56	1,00
	0,00	0,74	0,57	0,47	0,66
	0,00	0,68	0,27	0,56	0,92
M	0,00	0,70	0,52	0,45	0,68
S $\pm$	0,01	$\pm$ 0,13	$\pm$ 0,14	$\pm$ 0,10	$\pm$ 0,25

Tab. V: AC-AC μ mol/ml Medium

<u>ohne Konserv.</u>	0,00	0,28	0,00	0,26	0,21
	0,00	0,34	0,32	0,31	0,30
	0,00	0,15	0,27	0,31	0,23
	0,00	0,31	0,30	0,21	0,22
	0,00	0,20	0,25	0,27	0,22
	0,00	0,45	0,45	0,42	0,40
	0,00	0,43	0,41	0,42	0,38
	0,00	0,39	0,40	0,41	0,36
M	0,00	0,32	0,30	0,33	0,29
S $\pm$	0,00	$\pm$ 0,11	$\pm$ 0,14	$\pm$ 0,08	$\pm$ 0,08

<u>2 Std. Konserv.</u>	0,00	0,21	0,25	0,25	0,22
	0,01	0,21	0,27	0,23	0,17
	0,00	0,14	0,22	0,22	0,20
	0,00	0,34	0,59	0,60	0,57
	0,00	0,34	0,39	0,37	0,35
	0,01	0,21	0,42	0,42	0,38
	0,01	0,20	0,46	0,43	0,37
M	0,00	0,23	0,37	0,36	0,32
S $\pm$	0,00	$\pm$ 0,07	$\pm$ 0,13	$\pm$ 0,14	$\pm$ 0,14

AC-AC μ mol/ml Medium

	0	30	45	75	105 Min.
<u>4 Std. Konserv.</u>	0,01	0,28	0,59	0,63	0,51
	0,01	0,29	0,62	0,58	0,45
	0,00	0,10	0,31	0,26	0,39
	0,00	0,36	0,47	0,49	0,46
	0,00	0,23	0,46	0,43	0,39
	0,01	0,33	0,44	0,47	0,42
	0,01	0,18	0,37	0,28	0,27
M	0,00	0,25	0,46	0,45	0,41
S $\pm$	0,00	$\pm$ 0,09	$\pm$ 0,11	$\pm$ 0,14	$\pm$ 0,07

<u>8 Std. Konserv.</u>	0,00	0,17	0,43	0,45	0,46
	0,01	0,26	0,44	0,44	0,40
	0,01	0,26	0,46	0,46	0,41
	0,00	0,17	0,43	0,45	0,40
	0,00	0,36	0,44	0,43	0,40
	0,00	0,05	0,16	0,38	0,35
M	0,00	0,21	0,39	0,43	0,40
S $\pm$	0,00	$\pm$ 0,11	$\pm$ 0,11	$\pm$ 0,03	$\pm$ 0,03

Tab. V: Quotient B-HOB/AC-AC

<u>ohne Konservierung</u>	0,00	1,24	0,00	2,99	1,67
	0,00	0,90	0,30	1,39	1,39
	0,00	1,09	0,51	2,36	2,63
	0,00	1,44	0,82	1,02	1,85
	0,00	0,51	0,08	0,32	0,76
	0,00	0,56	0,26	0,30	1,30
	0,00	0,67	0,04	0,25	0,47
M	0,00	0,91	0,29	1,23	1,44
S $\pm$	0,00	$\pm$ 0,36	$\pm$ 0,29	$\pm$ 1,09	$\pm$ 0,71

Quotient β -HOB/AC-AC

	0	30	45	75	105 Min.
<u>2 Std. Konserv.</u>	0,00	2,58	1,00	2,60	3,62
	0,00	1,59	0,39	1,81	2,31
	0,00	1,94	0,26	0,66	1,51
	0,00	1,23	0,28	0,25	1,42
	0,00	3,17	0,86	1,08	2,16
	0,00	3,45	0,71	1,35	2,07
	0,00	3,16	1,59	1,34	1,34
M	0,00	2,44	0,73	1,30	2,06
S $\pm$	0,00	$\pm$ 0,87	$\pm$ 0,48	$\pm$ 0,76	$\pm$ 0,79
<u>4 Std. Konserv.</u>	0,00	2,49	0,58	0,52	1,67
	0,00	2,30	0,46	0,72	1,70
	0,00	4,14	1,49	2,20	1,93
	0,00	1,48	0,48	1,17	1,91
	0,00	3,35	0,88	1,14	2,03
	0,00	1,83	1,00	1,16	1,63
	0,00	3,67	1,24	2,53	3,50
M	0,00	2,75	0,87	1,35	2,05
S $\pm$	0,00	$\pm$ 0,99	$\pm$ 0,40	$\pm$ 0,74	$\pm$ 0,65
<u>8 Std. Konserv.</u>	0,00	4,93	1,31	0,72	0,87
	0,00	2,54	1,14	0,92	1,78
	1,00	3,04	1,16	1,21	2,46
	0,00	4,44	1,33	1,04	1,66
	0,00	3,17	0,86	1,08	2,16
	0,00	9,63	4,37	0,99	1,13
M	0,17	4,62	1,69	0,99	1,68
S $\pm$	0,41	$\pm$ 2,61	$\pm$ 1,32	$\pm$ 0,16	$\pm$ 0,60

Tab. VI: Glukose Δ , $\mu\text{mol}/\text{Gramm Leber}/\text{Min.}$

	0	30	45	75	105 Min.
<u>ohne Konserv.</u>	0,24	0,32	0,26	0,80	
	0,44	- 0,12	0,14	0,06	
	0,62	0,38	0,07	0,43	
	0,64	0,00	0,34	0,08	
	0,56	0,07	- 0,16	0,54	
	1,01	- 0,05	0,05	0,11	
	0,63	- 0,14	0,07	0,31	
M	0,59	0,06	0,11	0,33	
S $\pm$	0,23	$\pm$ 0,21	$\pm$ 0,16	$\pm$ 0,28	
<u>2 Std. Konserv.</u>	0,77	1,01	0,08	- 0,11	
	0,47	0,05	0,11	- 0,11	
	0,36	0,86	0,02	0,55	
	0,27	0,20	- 0,08	0,49	
	0,41	0,29	- 0,12	0,71	
M	0,46	0,48	0,02	0,31	
S $\pm$	0,19	$\pm$ 0,42	$\pm$ 0,10	$\pm$ 0,39	
<u>4 Std. Konserv.</u>	0,42	0,25	0,05	0,25	
	0,29	0,87	- 0,16	0,47	
	0,20	0,39	- 0,14	0,21	
	0,55	- 0,27	0,00	0,28	
	0,08	0,03	- 0,21	0,63	
	0,34	0,14	- 0,19	0,18	
	0,30	0,06	0,43	0,02	
M	0,31	0,21	- 0,03	0,29	
S $\pm$	0,15	$\pm$ 0,35	$\pm$ 0,22	$\pm$ 0,20	

Glukose Δ , $\mu\text{mol}/\text{Gramm Leber}/\text{Min.}$

	0 $\longleftrightarrow$ 30	30 $\longleftrightarrow$ 45	45 $\longleftrightarrow$ 75	75 $\longleftrightarrow$ 105 Min.
<u>8 Std. Konserv.</u>	0,26	- 0,42	0,08	0,10
	- 0,01	0,37	0,08	- 0,57
	0,95	- 0,73	0,32	0,61
	0,46	0,52	0,21	- 0,08
	0,39	- 0,15	0,10	0,44
	1,02	- 0,81	0,97	0,36
M	0,51	- 0,20	0,29	0,14
S $\pm$	0,40	$\pm$ 0,56	$\pm$ 0,34	$\pm$ 0,43

Tab. VII: Harnstoff Δ , $\mu\text{mol}/\text{Gramm Leber}/\text{Min.}$

<u>ohne Konserv.</u>	0,20	1,50	0,97	0,00
	0,16	0,43	0,88	0,23
	0,15	0,59	1,38	0,62
	0,20	0,72	1,04	0,21
	0,14	0,96	0,76	0,58
	- 0,02	0,83	0,56	- 0,48
	0,18	0,80	0,47	0,03
	- 0,12	0,86	0,70	0,28
M	0,11	0,84	0,84	0,18
S $\pm$	0,11	$\pm$ 0,31	$\pm$ 0,29	$\pm$ 0,35
<u>2 Std. Konserv.</u>	0,03	1,14	0,55	0,19
	0,08	0,98	0,40	0,19
	0,04	1,57	0,78	0,13
	0,10	1,11	0,90	0,12
	0,11	2,06	1,06	0,32
M	0,07	1,37	0,74	0,19
S $\pm$	0,03	$\pm$ 0,44	$\pm$ 0,26	$\pm$ 0,08

Harnstoff Δ , $\mu\text{mol}/\text{Gramm Leber}/\text{Min.}$

0 $\longleftrightarrow$ 30 $\longleftrightarrow$ 45 $\longleftrightarrow$ 75 $\longleftrightarrow$ 105 Min.

4 Std. Konserv.

	0,17	1,17	0,84	0,41
	0,17	1,15	0,97	1,03
-	0,03	0,65	0,27	0,58
	0,28	0,90	0,86	0,28
	0,10	0,65	0,73	0,23
	0,04	0,61	0,34	0,27
	0,00	3,92	0,81	0,42
M	0,10	1,29	0,69	0,46
S $\pm$	0,11	$\pm$ 1,18	$\pm$ 0,27	$\pm$ 0,28

8 Std. Konserv.

	0,05	0,15	0,48	0,41
	0,13	1,01	0,92	0,65
	0,14	1,07	0,87	0,03
	0,00	2,84	0,14	1,13
	0,24	1,17	2,43	- 0,66
-	0,01	- 0,16	0,57	1,31
M	0,09	1,01	0,90	0,48
S $\pm$	0,10	$\pm$ 1,05	$\pm$ 0,80	$\pm$ 0,73

IX. Literaturverzeichnis

1. ABOUNA, G.M.:
Pig Liver Perfusion with Human Blood
The Effect of Preparing and Flushing the Liver
with Various Balanced Solutions on its Subsequent
Viability and Function
Brit. J. Surg. 55 (1968) 761-768
2. ACHENBACH, J.:
Methodische Untersuchungen zur Optimierung und
Standardisierung der Bestimmung von Pyruvat in vivo
Dissertation, Marburg 1976
3. BÄSSLER, K.H., G.WAGNER, B.HEICKE:
Dynamik des Ketonkörperstoffwechsels bei gesunden
Ratten
Z. ges.-exp. Med. 153 (1970) 131-135
4. BÄSSLER, K.H., H.BRINKROLF:
Die Rolle von Oxalacetat bei der gesteigerten
Ketogenese und beim antiketogenen Effekt
Z. ges.-exp. Med. 156 (1971) 52-60
5. BERGMAYER, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., Bd. I, II (1970)
6. BIRNBAUM, D., T.SOYER, B.EISEMAN:
Studies in Prolonged Liver Preservation
Surgery 72 (1972) 722-729
7. BIRTCH, A.G., F.D.MOORE:
Experience in Liver Transplantation
Transplant. Rev. 2 (1969) 90

8. BREMER, J., K.S.BJERVE, B.O.CHRISTOPHERSEN,
L.N.W.DAAE, H.E.SOLBERG, M.AAS:
Factors Controlling the Metabolism of Fatty
Acids in the Liver
in: Regulation of Hepatic Metabolism S. 159-180
Hrsg. Frank Lundquist, N. Tygstrup
Academic Press Inc. New York, London (1974)
9. BREITSCHNEIDER, L., T.E.STARZL:
Organ Perfusion and Preservation Conference
Boston, May 1968
10. CALNE, R.Y.:
Surgical Aspects of Clinical Liver
J. Surg. 56 (1969) 729
11. CALNE, R.Y., D.C.DUNN, B.M.HERBERTSON, E.M.GORDON,
H.BITTER-SUERMAN, A.J.ROBSON, A.S.MACDONALD,
D.R.DAVIS, D.P.SMITH, F.H.REITTER, L.M.WEBSTER:
Liver Preservation by Single Passage Hypothermic
"Squirt" Perfusin
Brit. Med. J. 4 (1972) 142-144
12. CALNE, R.Y.:
Observation on Liver Transplantation
Symposion Bonn 1972
in: Liver Transplantation S. 39-46
Hrsg. Lie, T.S., A.Gütgemann
Verlag Gerhard Witzstrock GmbH
Baden-Baden, Brüssel (1974)
13. CHOMETTE, G., A.AURIOL, A.DELCOURT, C.BROCHERION,
G.PERIE, J.-C.HAMMOU, H.GARNIER:
Conservation de foies de Porc sous hypothermie,
perfusion, hyperbarie
I. Morphologie optique et ultrastructurale
Path.-Biol. 19 (1971) 459-472

14. DALE, R.A.:
Effects of Sampling Procedures on the Contents of
Some Intermediate Metabolites of Glycolysis in
Rat Tissues
J. Physiol 181 (1965) 701-711
15. DRAZ, S., R.MINAMI, J.BYFIELD, E.W.FONKALSRUD:
Biochemical Evaluation of Hepatic Preservation
Techniques in the Isolated Rat Liver
Surgery St. Louis, 70 (1971) 446-451
16. EISEMAN, B., P.KNIPE, H.A.MCCOLL, M.J.ORLOFF:
Isolated Liver Perfusion for Reducing Blood Ammonia
Arch. of Surgery 83 (1961) 356-363
17. EISEMAN, B., T.SOYER:
Prosthetics in Hepatic Assistance
Transpl. Proc. 3 (1971) 1519-1526
18. FAUPEL, R.P., H.J.SEITZ, W.TARNOWSKI, V.THIELMANN,
CH.WEISS:
The Problem of Tissue Sampling from Experimental
Animals with Respect to Freezing Technique, Anoxia,
Stress and Narcosis
A New Method for Sampling Rat Liver Tissue and the
Physiological Values of Glycolytic Intermediates
and Related Compounds
Arch. of Biochem. and Biophysics 148 (1972) 509-522
19. FÜRSTER, E., A.W.HOLLDORF, H.FALK:
Probleme der Stoffwechselregulation in der Leber
II. Regulationsmechanismen im Kohlenhydratstoffwechsel
in: Acta Hepato-Splenologica 15 (1968) 257-274
20. FÜRSTER, E., A.W.HOLLDORF, H.FALK:
Probleme der Stoffwechselregulation in der Leber
III. Regulationsmechanismen im Lipidstoffwechsel
in: Acta Hepato-Splenologica 15 (1968) 292-307

21. FÖRSTER, E., H.E.MEYER, M.ZIEGE:
Hepatische Glykogensynthese in Abhängigkeit von der
Blutglukosekonzentration bei narkotisierten Ratten
Klin. Wschr. 50 (1972) 478-480

22. GARRISON, J.C., R.C.HAYNES, Jr.:
Hormonal Control of Glycogenolysis and Gluconeogenesis in Isolated Rat Liver Cells
J. Biol. Chem. 248 (1973) 5333-5343

23. GLOGNER, P.:
Zum Ammoniakstoffwechsel der Leber
Z. ges. exp. Med. 144 (1967) 210-216

24. GLOGNER, P., H.J.SCHUREK, W.KAUFMANN:
Wird der Kohlenhydratstoffwechsel der Leber durch
hohe Harnstoffkonzentrationen und Azidose beeinflusst?
Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber
Z. f. Gastroenterologie 8 (1970) 31-35

25. GRAF, J., R.KASCHNITZ, M.PETERLIK:
Erweiterte Möglichkeiten der Perfusionstechnik durch
kontinuierliche Dialyse der Durchströmungsflüssigkeit:
Metabolit und Gallesekretion der isolierten Rattenleber
Res. exp. Med. 157 (1972) 12-18

26. GÜTGEMANN, A., T.S.LIE, C.KÄUFER, G.ESSER,
K.H.SCHRIEFERS, K.J.PAQUET, M.SIEDEK:
Aktuelle Probleme der Lebertransplantation
Bisherige Erfahrungen bei sechs Lebertransplantationen
Dtsch. med. Wschr. 100 (1975) 2047-2052

27. HANSON, R.W., M.S.PATEL, L.RESHEF, F.J.BALLARD:
The Role of Pyruvate Carboxylase and P-enol-pyruvate
Carboxykinase in Rat Adipose Tissue
in: Regulation of Gluconeogenesis S. 255-276
Hrsg. Söling, H.D., B.Willms
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1971)

28. HELL, E., O.BOECKL, TH.DRAPANAS:
Probleme der Leber- und Nierenkonservierung
Wiederbelebung - Organersatz - Intensivmedizin
6, (1968) 50-60

29. HEMS, R., B.D.ROSS, M.N.BERRY, H.A.KREBS:
Gluconeogenesis in the Perfused Rat Liver
Biochem. J. 101 (1966) 284-292

30. HEMS, D.A., P.D.WHITTON, E.A.TAYLOR:
Glycogen Synthesis in the Perfused Liver of the
Starved Rat
Biochem. J. 129 (1972) 529-538

31. HERS, H.G., W.STALMANS, H.DE WULF, M.LALOUX, L.HUE:
The Control of Glycogen Metabolism in the Liver
in: Regulation of Hepatic Metabolism S. 237-249
Hrsg. Lundquist, F., N.Tygstrup
Academic Press Inc., New York, London (1974)

32. HICKMAN, R., S.J.SAUNDERS, E.SIMSON, J.TERBLANCHE:
Perfusion of the Isolated Pig Liver
Functional Assessment under Control Normothermic
Conditions
Brit. J. Surg. 58 (1971) 33-38

33. HÖLLER, M., H.BREUER:
Eine optimale Methode zur hämoglobinfreien
Perfusion der isolierten Rattenleber
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 (1974) 398-402

34. HOHORST, H.J., F.KREUTZ, TH.BÜCHER:
Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen
in der Leber der Ratte
Biochem. Z. 332 (1959) 18-46

35. HOHORST, H.J.:
Der Reduktionszustand des Diphosphopyridin-
Nukleotidsystem im lebenden Gewebe
Eine Studie über Metabolitgleichgewichte in der
Rattenleberzelle
Dissertation, Marburg 1960
36. HOHORST, H.J., P.ARESE, H.BARTELS, D.STRATMANN,
H.TALKE:
III. Metabolic Pathways of Lactate Isomers in
Higher Systems
L(+)Lactic Acid and the Steady State of Cellular
Red/Ox-Systems
Ann. N.Y. Acad. Sci. 119 (1965) 974-994
37. KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und
Naturwissenschaftler
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967)
38. KESSLER, M., R.SCHUBOTZ:
Die O₂-Versorgung der hämoglobinfrei perfundierten
Rattenleber
in: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
S. 12-20
Hrsg. W. Staib, R.Scholz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)
39. KESSLER, M., H.LANG, H.STARLINGER:
Regulation der Pyruvat- und Laktatspiegel durch
die isoliert perfundierte Leber bei unterschiedlichen
CO₂- und O₂-Drucken
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 279
40. KREBS, H.A.:
The Regulation of the Release of Ketone Bodies
by the Liver
Advanc. Enzyme Regulation 4 (1966) 339-353

41. KREBS, H.A.:
Formation of Ketone Bodies in the Perfused Rat Liver
in: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
S. 129-139
Hrsg. W. Staib und R.Scholz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)
42. KREBS, H.A.:
Gluconeogenesis and Redox State
in: Regulation of Gluconeogenesis S. 114-117
Hrsg. H.-D. Söling, B.Willms
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971)
43. KREBS, H.A.:
Metabolic Requirements of Isolated Organs
Transpl. Proc. 6 (1974) 237-239
44. LEUTHARDT, F.:
Lehrbuch der physiol. Chemie
Walter de Gruyter & Co. Berlin (1963)
45. LIE, T.S., E.STRUCK, U.HOMOTH, V.TOTOVIC,
R.TAUBER, J.NITSCHKE, H.HAMELMANN:
Vierstündige Leberkonservierung durch einfache
Hypothermie. Transplantation und biochemische Befunde
Z. ges. exp. Med. 155 (1971) 211-224
46. MARBACH, E.P., M.H.WEIL:
Rapid Enzymatic Measurement of Blood Lactate
and Pyruvate
Use and Significance of Metaphosphoric Acid as
a Common Precipitant
Clin. Chem. 13 (1967) 314-325

47. MATTENHEIMER, H.:
Die Theorie des enzymatischen Tests
Hrsg. Boehringer Mannheim GmbH
Biochemica (1971)

48. MENAHAN, L.A., B.D.ROSS, O.WIELAND:
Studies on the Mechanism of Fatty Acid and
Glucagon Stimulated Gluconeogenesis in the
Perfused Rat Liver
in: Stoffwechsel der isoliert perfundierten
Leber S. 142-152
Hrsg. W. Staib, R.Scholz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)

49. MIENY, C.J., B.EISEMAN:
Liver Preservation: Unperfused Cold Storage and
Continous Cold Perfusion
Surgery 63 (1968) 923-929

50. MIENY, C.J., J.A.MYBURGH:
Successfull 20-HR-Preservation of the Primate
Liver by Simple Cooling
Transpl. 11 (1971) 495-497

51. MIERTSCH, H.J., L.ROKA:
Ammoniakverwertung und Harnstoffsynthese der
isoliert perfundierten Rattenleber
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10 (1972) 416-419

52. MIERTSCH, H.J.:
Ammoniakverwertung und Harnstoffsynthese durch
die isoliert perfundierte Rattenleber
Dissertation, Gießen (1973)

53. MILLER, L.L., C.G.BLY, M.L.WATSON, W.F.BALE:
The Dominant Role of the Liver in Plasma Protein
Synthesis
A Direct Study of the Isolated Perfused Rat Liver
with the Aid of Lysine- ϵ -C¹⁴
J. Exp. Med. 94 (1951) 431-453

54. MÜLLHOFER, G., E.LOY:
Stimulierung der Gluconeogenese aus Lactat in
der isoliert perfundierten Rattenleber durch
 $N^6, O^{2'}$ -Dibutyryladenodin-3', 5'-monophosphat
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 1551-1552
55. MÜLLHOFER, G., E.LOY, P.WOLLENBERG, R.KRÄMER:
A Possible Role of the Glycerol Phosphate Cycle in
Cyclic AMP-Stimulated Gluconeogenesis from Lactate
in Perfused Rat Livers
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355 (1974) 239-254
56. MØRLAND, J., T.CHRISTOFFERSEN, J.-B.OSNES:
Acid Production in the Isolated Perfused Rat Liver
Acta physiol. scand. 89 (1973) 61-67
57. NITSCHKE, J., G.KORB, E.STRUCK, H.J.REITER, C.H.KÖNIG,
D.MERLE, H.HAMELMANN:
Morphological Changes of the Autoperfused Heart-
Lung-Liver-Preparation (HLLP) of the Pig during
Normothermic Preservation
in: Liver Transplantation S. 185-188
Hrsg. T.S. Lie, A.Gütgemann
Verlag Gerhard Witzstrock GmbH, Baden-Baden, Brüssel
(1974)
58. RAPOPORT, S.M.:
Medizinische Biochemie
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1969)
59. Report of Meeting
Workshop on Organ Preservation
Surgery 69 (1971) 321-325
60. RIEGER, H.-J.:
Arztrecht in der Praxis: Zum Transplantations-
gesetz
Dtsch. Med. Wschr. 6 (1975) 259-261

61. PAUSCH, J., W.GEROK:
Biochemische und pathologische Aspekte der
Hyperammoniämie
Klin. Wschr. 55 (1977) 97-103
62. PENN, J., T.E.STARZL:
Experience in the Human Orthotopic Liver Transplantation
- Indication, Results and Future Prospects -
1. Intern. Bonner Lebertransplantations-Symposium
vom 23.-25.6.1972
in: Liver Transplantation S. 27-38
Hrsg. T.S. Lie, A.Gütgemann
Verlag Gerhard Witzstrock GmbH, Baden-Baden, Brüssel
(1974)
63. PERIE, G., G.CHOMETTE, M.AURIOL, A.DELCOURT,
C.BROCHERION, J.-C.HAMMON, H.GARNIER:
Conservation de foies de Porcs sous hypothermie,
perfusion, hyperbarie
II. Etude histoenzymologique
Path.-Biol. 19 (1971) 473-488
64. PITZELE, S.:
Important Factors in Extracorporeal Organ
Support with Special Reference to the Heart
Canadian J. Surg. 14 (1971) 100-113
65. SCHIMASSEK, H.:
Perfusion of Isolated Rat Liver with a Semisynthetic
Medium and Control of Liver Function
Life Sci. 11 (1962) 629-634
66. SCHIMASSEK, H.:
Regulation of Lactate and Pyruvate Levels in
Perfusion Medium by the Isolated Rat Liver
Life Sci. 11 (1962) 635-638

67. SCHIMASSEK, H.:
Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der
isoliert perfundierten Rattenleber
Biochem. Z. 336 (1963) 460-467
68. SCHIMASSEK, H.:
Der Einfluß der Leber auf den extracellulären
Redox-Quotienten Lactat/Pyruvat
Biochem. Z. 336 (1963) 468-473
69. SCHIMASSEK, H.:
Wechselspiel zwischen Leberfunktion und Blut-
substraten
in: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
S. 109-117
Hrsg. W. Staib, R.Scholz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)
70. SCHIMASSEK, H.:
Möglichkeiten und Grenzen der Methodik
in: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
S. 1-10
Hrsg. W. Staib, R.Scholz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)
71. SCHIMASSEK, H.:
The Effect of Alcohol on the Embden-Meyerhof-Parnas-
Pathway in the Liver
in: Metabolic Changes Induced by Alcohol S. 157-165
Hrsg. G.A. Martini, CH.Bock
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1971)
72. SCHIMASSEK, H., A.K.WALLI, W.LANGHANS, P.MAYER:
Glycolysis and Gluconeogenesis in the Rat Liver
in: Regulation of Hepatic Metabolism S. 92-104
Hrsg. F. Lundquist, N.Tygstrup
Academic Press Inc., New York, London (1974)

73. SCHMAHL, F.W., E.BETZ, H.TALKE, H.-J.HOHRST:
Energereiche Phosphate und Metabolite des Energie-
stoffwechsels in der Großhirnrinde der Katze
Biochem. Z. 342 (1965) 518-531
74. SCHMAHL, F.W., E.BETZ, E.DETTINGER, H.-J.HOHRST:
Energistoffwechsel der Großhirnrinde und
Elektencephalogramm bei Sauerstoffmangel
Pflügers Archiv 292 (1966) 45-59
75. SCHMIDT, E., F.W.SCHMIDT, C.HERFARTH, K.OPITZ,
W.VOGELL:
Studien zum Austritt von Zell-Enzymen am Modell
der isolierten, perfundierten Ratten-Leber
III. Mitteilung: Analyse des bei Perfusion unter
Hypoxie entstehenden extracellulären Enzymmusters
Enzym. biol. clin. 7 (1966) 185-202
76. SCHMIDT, E., F.W.SCHMIDT, C.HERFARTH, K.H.DETTMAR,
H.FABEL:
Studien zum Austritt von Zell-Enzymen am Modell
der isoliert perfundierten Rattenleber
II. Mitteilung: Untersuchungs-Methoden und Studien
über Wahl des Perfusions-Mediums und Vergleichbar-
keit der Enzym-Muster verschiedener Leber-Lappen
Enzym. biol. clin. 7 (1966) 167-187
77. SCHMIDT, E., F.W.SCHMIDT, P.LESCH, L.SIEGISMUND,
H.BOCKHORN, R.PICHLMAYR:
Enzyme Activities in the Liver and Serum of Pigs
after Allogenic Liver Transplantation
in: Liver Transplantation S. 73-78
Hrsg. T.S. Lie, A.Gütgemann
Verlag Gerhard Witzstrock GmbH, Baden-Baden,
Brüssel (1974)

78. SCHOLZ, R., TH.BÜCHER:
Hemoglobin-Free Perfusion of Rat Liver in
Control of Energy Metabolism
S. 393-414
Hrsg. B. Chance, R.W.Estabrook, J.R.Williamson
Academic Press New York (1965)
79. SCHOLZ, R.:
Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung bei
der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber
in: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
S. 25-47
Hrsg. W. Staib, R.Scholz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)
80. SELL, K.W., W.M.ABBOTT, E.L.DUPREE Jr.:
The Role of Organ Preservation in Transplantation
Transpl. Proc. 1 (1969) 781-794
81. SIES, H., D.HÄUSSINGER, M.GROSSKOPF:
Mitochondrial Nicotinamide Nucleotide Systems:
Ammonium Chloride Responses and Associated Metabolic
Transitions in Hemoglobin-Free Perfused Rat Liver
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 335 (1974) 305-320
82. SÖLING, H.D., J.KLEINIK, B.WILLMS, G.JANSON, A.KUHN:
Relationship between Intracellular Distribution
of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase
Regulation of Gluconeogenesis and Energy Lost of
Glucose Formation
Europ. J. Biochem. 37 (1973) 233-243
83. SÖLING, H.D.:
Anion Transport through the Inner Mitochondrial
Membrane -
Site of Regulation of Gluconeogenesis?
in: Regulation of Hepatic Metabolism S. 48-58
Hrsg. Frank Lundquist, N.Tygstrup
Academic Press Inc., New York-London (1974)

84. SOYER, T., M. LEMPINEN, B. EISEMAN:
In Vitro Extracorporeal Liver Slices and Cell
Suspensions for Temporary Hepatic Support
Ann. of Surg. 177 (1973) 393-401

85. SPILG, H., J. TERBLANCHE:
Liver Storage
S. A. Med. J. 45 (1971) 1160-1162

86. STÄHLER, F., I. SINN:
Über den Stoffwechsel der isoliert perfundierten
Rattenleber nach Bestrahlung in vitro
I. Mitteilung: Lactat, Pyruvat, Glucose, Kalium,
Natrium und Chlorid sowie die Aktivität der GOT
und GPT im Perfusionsplasma
Strahlentherapie Sonderdruck 139/4
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien (1970)

87. STALLKAMP, B., V. GOEHLICH, R. HÄRING, A. HIRNER,
L. C. TUNG, J. WALDSCHMIDT:
Über den Ammoniakbelastungstest bei der isoliert
perfundierten Schweineleber
Z. Exper. Chirurg. 7 (1974) 179-187

88. STARZL, T. E., T. L. MARCHIORO, R. T. HUNTLEY, D. RIFKIND,
D. T. ROWLANDS Jr., T. C. DICKINSON, W. R. WADDELL:
Experimental and Clinical Homotransplantation
of the Liver
Rev. Int. Hep. 15 (1965) 1447

89. STARZL, T. E.:
Experience in Hepatic Transplantation
Philadelphia: Saunders (1969)

90. STARZL, T. E., G. GILES, J. R. LILLY, H. TAKAGI, G. MARTINEAU,
G. SCHROETER, C. G. HALGRIMSON, I. PENN, C. W. PUTNAM:
Indications for Orthotopic Liver Transplantation:
With Particular Reference to Hepatomas, Biliary Atresia,
Cirrhosis, Wilson's Disease and Serum Hepatitis
Transpl. Proc. 3 (1971) 308-312

91. STARZL, T.E., K.A.PORTER, C.W.PUTNAM, G.P.J.SCHROETER,
C.G.HALGRIMSON, R.WEIL III, M.HOELSCHER, H.A.S.REID:
Orthotopic Liver Transplantation in Ninety Three
Patients
Surgery 142 (1976) 487-505
92. STRUCK, E., J.ASHMORE, O.WIELAND:
Effects of Glucagon and Long Chain Fatty Acids on
Glucose Production by Isolated Perfused Rat Liver
Advances in Enzyme Regulation 4 (1966) 219-224
93. STRUCK, E., H.HAMELMANN:
Lebertransplantation
in: Indikation zur Operation S. 331-334
Hrsg. G. Heberer, G.Hegemann
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1974)
94. STRUCK, E., K.MÜLLER, J.NITSCHKE, R.SCHÄFER, K.SCHUSTER,
H.J.REITER, H.HAMELMANN:
Course and Assessment of Liver Function Including
Coagulation
Factors in Orthotopic Pig Liver Transplantation
in: Liver Transplantation
Hrsg. T.S. Lie, A.Gütgemann
Verlag Gerhard Witzstrock GmbH, Baden-Baden, Brüssel
(1974)
95. STRUCK, E., J.NITSCHKE, H.J.REITER, H.OSTER,
B.SCHEFFER, F.WELTER, W.SEIDEL, H.HAMELMANN:
Biochemical Findings after Orthotopic Transplantation
of the Pig Liver
in: Liver Transplantation S. 103-107
Hrsg. T.S. Lie, A.Gütgemann
Verlag Gerhard Witzstrock GmbH, Baden-Baden, Brüssel
(1974)

96. TOTOVIC, V., R.LAGACE, T.S.LIE, E.BÜSSELBERG,
T.YAMAMOTO:
Zur Ultrastruktur der Schweineleber bei 24-stündiger
einfacher hypothermer Konservierung
Res. exp. Med. 158 (1972) 129-151
97. WALDSCHMIDT, J., G.BECK, H.BOTSCH, S.DRESSLER, W.HAUCK,
R.HÄRING, R. DE PENA PEREZ, B.STALLKAMP, L.C.TUNG:
Organperfusion: Klinische und experimentelle
Erfahrungen mit der Leberperfusion
Z. Exper. Chirurgie 4 (1971) 209-215
98. WALDSCHMIDT, J., R.HÄRING, W.HAUCK, A.HIRNER,
E.KOURIAS, D.RODEBARTH, B.STALLKAMP, L.C.TUNG:
Langzeitperfusionen der Leber mit kryopräzipitiertem
Serum
Res. exp. Med. 157 (1972) 262-264
99. WALTER, P., J.W.STUCKI:
Regulation of Pyruvate Metabolism in Rat Liver
Mitochondria
in: Regulation of Gluconeogenesis S. 79-92
Hrsg. Söling, H.-D., B.Willms
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1971)
100. WALTER, P., M.R. DE SAGARRA:
Gibt es einen zweiten Weg der Gluconeogenese?
Hoppe Seyler's Z. Physiol. (chem. 353 (1972) 1574
101. WILLIAMSON, D.H., P.LUND, H.A.KREBS:
The Redox State of Free Nicotinamide-Adenine
Dinucleotide in the Cytoplasm and Mitochondria
of Rat Liver
Biochem. J. 103 (1967) 514-527

102. WILLIAMSON, J.H., E.V.ELLINGTON, V.ILIC, J.SAAL:
Hepatic Effects of Saturated and Unsaturated Short
Chain Fatty Acids and the Control of Ketogenesis
in Vivo
in: Regulation of Hepatic Metabolism S. 191-209
Hrsg. Frank Lundquist, N.Tygstrup
Academic Press Inc., New York-London (1974)
103. WILLIAMSON, J.-R., A.J.MEIJER, K.OHKAWA:
Interrelations between Anion Transport, Ureogenesis
and Gluconeogenesis in Isolated Rat Liver Cells
in: Regulation of Hepatic Metabolism S. 457-479
Hrsg. Frank Lundquist, N.Tygstrup
Academic Press Inc., New York-London (1974)
104. WILLMS, B., H.D.SÖLING:
Regulation der Gluconeogenese durch Fettsäure-
oxydation in der isoliert perfundierten Rattenleber
in: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
S. 118-128
Hrsg. W. Staib, R.Scholz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)
105. WILLMS, B., J.KLEINEKE, H.D.SÖLING:
On the Redox State of NAD^+/NADH System in Guinea
Pig Liver under Different Experimental Conditions
in: Regulation of Gluconeogenesis S. 103-114
Hrsg. H.D. Söling, B.Willms
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971)
106. WIMHURST, J.M., K.L.MANCHESTER:
Induction and Suppression of the Key Enzymes of
Glycolysis and Gluconeogenesis in Isolated Perfused
Rat Liver in Response to Glucose, Fructose and
Lactate
Biochem. J. 134 (1973) 143-156

107. WINER, B.J.:
Statistical Principles in Experimental Design
S. 105-114
Ljubljana (1970)
108. WOLFF, H., J.WALTHER, P.STRASSBURGER:
Das Verhalten der Enzymaktivität und der Metabolite
(ATP, Lactat) im Lebergewebe vor und nach
Konservierung
Z. Exper. Chirurg. 6 (1973) 150-155
109. WOODS, H.F., H.A.KREBS:
Lactate Production in the Perfused Rat Liver
Biochem. J. 125 (1971) 129-139
110. WYK, VAN J., D.S.LIEM, B.EISEMAN:
Function of Cadaver Liver
Surgery 58 (1965) 120-130
111. WYK, VAN J., I.TAIT, B.EISEMAN:
Function of Livers Left for Graded Periods within
the Cadaver
Surgery 58 (1965) 374-380

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. H. Hamelmann, mit dessen Zustimmung diese Untersuchungen in der Chirurgischen Universitätsklinik durchgeführt werden konnten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. J. Nitschke für die Überlassung des Themas, seine stete Unterstützung und wertvolle Anleitung zu dieser Arbeit.

Ferner danke ich Herrn K. Schuster für die operationstechnische Hilfe sowie sein kritisches Engagement bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchungen.

Weiterhin danke ich Frau Marianne Gräb-Linsel, MTA an der Chirurgischen Universitätsklinik, für ihre zuverlässige und hilfreiche labortechnische Assistenz.

Lebenslauf

Am 5.11.1941 wurde ich als 3. Kind der Eheleute Emil Willigerodt und seiner Frau Elli, geb. Blecke, in Goslar/H. geboren. Dort besuchte ich von 1948 - 1952 die Volksschule, von 1952 ab die Städt. Mädchen-Mittelschule. Durch den Stellungswechsel meines Vaters setzte ich meine Ausbildung an der Städt. Realschule in Bonn/Beuel fort und erwarb hier 1958 die Mittlere Reife. Daran schloß sich der Besuch der 2-jährigen Städt. Höheren Handelsschule in Bonn. Von 1960 - 1962 arbeitete ich im Büro der Zentralen Markt- und Preisberichtsstelle der Deutschen Landwirtschaft GmbH. Zur Intensivierung meiner französischen Sprachkenntnisse folgte von 1962 bis 1963 ein Auslandsaufenthalt in Genf/Schweiz; von 1963 - 1968 erneute Berufstätigkeit in der Deutschen Stiftung für europäische Friedensfragen e.V. in Bonn mit Beurlaubung für das SS 1964 zur Fortsetzung des Sprachstudiums an der Sprachen- und Dolmetscherschule in München. Seit 1965 bereitete ich mich in Abendkursen auf die Reifeprüfung für Nichtschüler vor und legte diese am 26. Oktober 1967 am Kaiser-Karls-Gymnasium in Aachen ab.

Im Sommersemester 1968 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn mit dem Studium der Zahnheilkunde. Im Frühjahr 1969 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Frühjahr 1971 die zahnärztliche Vorprüfung. Mein Staatsexamen in der Zahnheilkunde legte ich am 25.1.1974 in Marburg ab. Nach Abschluß der experimentellen Untersuchungen meiner Dissertation machte ich 1975 einige zahnärztliche Praxisvertretungen. Seit dem 1.1.1976 bin ich als wiss. Angestellte in der Zahn-, Mund- und Kieferklinik der Universität Marburg tätig.

Seit dem 29.10.1976 bin ich mit dem Arzt Dr. Hans-Henning Pries verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professoren und Dozenten:

Aurich, Bernhardt, Bock, Castenholz, Dimroth,
von Ditfurth, Engelhardt, Goebell, Haan, Hamelmann,
Havemann, Hein, Hennis, Hering, Heuser, Hort, Janke,
Karlson, Keil, Koecke, Kühnel, Mahr, Mann, Niemeyer,
Nöth, Oehmig, Petry, Pfütz, Riecken, Rohen, Rosemann,
Rupac, Schienbein, Schiff, Schmid, Schmidt,
Schmitz-Moormann, Schnell, Seidel, Siefert, Streicher,
Walcher, Zilliken.

